

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ»
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ С.З. ГЖИЦЬКОГО

Кваліфікаційна наукова праця на
правах рукопису

ГОРЮК ЮЛІЯ ВІКТОРІВНА

УДК 619:615.038:615.28:578:579

ДИСЕРТАЦІЯ
**ОБҐРУНТУВАННЯ, РОЗРОБКА ТА ЗАСТОСУВАННЯ
БАКТЕРІОФАГОВОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ КОРІВ,
ХВОРИХ НА МАСТИТ**

16.00.04 – ветеринарна фармакологія та токсикологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Ю.В. Горюк

Кам'янець-Подільський – 2023

АНОТАЦІЯ

Горюк Ю. В. Обґрунтування, розробка та застосування бактеріофагового препарату для лікування корів, хворих на мастит. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.04 – ветеринарна фармакологія та токсикологія. Заклад вищої освіти «Подільський державний університет». Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Львів, 2023.

Розробка ефективних та екологічно безпечних фармакологічних препаратів для лікування корів за маститу, які активно діють проти антибіотикостійких штамів бактерій, досі є актуальною. Золотистий стафілокок є основним збудником маститу корів у всьому світі. Особливістю стафілококового маститу є високий ризик передачі *S. aureus* між тваринами та здатність збудника зберігатися у вимені корів у формі субклінічної інфекції. Оскільки *S. aureus*, зазвичай, має високу стійкість до антибіотиків і його практично неможливо знищити, вся антибіотикотерапія стає субінгібуючою, а патоген набуває ще більшої антибіотикостійкості. Той факт, що кожне застосування антимікробних засобів сприяє виникненню резистентності до бактеріальних ізолятів вимагає загального скорочення використання антимікробних засобів у гуманній та ветеринарній медицині. Це підкреслює необхідність альтернативних рішень для лікування бактеріальних інфекцій, включаючи лікування маститу.

На даний час дослідники недостатньо звертають увагу на можливість використання специфічних бактеріофагів, які циркулюють безпосередньо на молочних фермах в Україні. Особливо це стосується такого захворювання, як субклінічний мастит корів, який завдає значні економічні збитки через розвиток антибіотикорезистентності у збудників та необхідністю бракування молока.

Дисертаційна робота спрямована на теоретичне та експериментальне обґрунтування розробки фагового препарату, літичного до збудника маститу корів *S. aureus variant bovis* та його комплексну фармако-токсикологічну оцінку. Визначено фармакодинаміку та біотехнологічні підходи щодо препаратів на основі бактеріофагів, специфічних до збудників маститу корів. Розроблено внутрішньоцестернальний препарат Фагомаст діючою складовою, якого є високолітичний фаг *Phage SAyB14* з титром не менше 10^7 БУО/см³, який лізує збудника маститу корів *S. aureus var. bovis*. Даний препарат можна використовувати як альтернативу антибіотикам за умови одержання екологічно безпечного молока.

При визначенні показників безпеки препарату Фагомаст, встановлено, що гострої токсичності Фагомасту встановлено, що його DL_{50} становить більше 5000 мг/кг живої маси тварин. Також не встановлено кумулятивної дії на організм лабораторних тварин, так як при патологоанатомічному розтині після евтаназії мишей, видимих макроскопічних змін у внутрішніх органах не виявлено. Вивчення подразнювальної дії препарату Фагомаст не виявило будь-яких видимих змін на епідермісі піддослідних тварин. Крім того, розчини препарату Фагомаст не впливали на зміну поведінки тварин дослідної групи.

За вивчення сенсibilізувальної дії препарату Фагомаст з'ясовано, що в перші хвилини після аплікації препаратом тварини робили спробу його злизати, далі їх поведінка не відрізнялась від звичайної. На поверхні шкіри протягом 2-х годин не виявляли змін. Дослідження ділянок шкіри із аплікацією розчинами препарату Фагомаст будь-яких патологічних клінічних ознак не виявило. Отже, препарат Фагомаст не викликає подразнювальної і сенсibilізувальної дії.

Вивчення шкірно-резорбтивних властивостей препарату Фагомаст не виявило клінічних ознак токсичності, що вказували результати досліджень – всі миші залишалися живими зі збереженням алегиту і адекватності поведінки.

Крім того встановлено, що препарат Фагомаст навіть у максимальній дозі не викликав змін загального стану, роботи серцево-судинної, дихальної,

травної, нервової та сечовидільної систем. Під час патологоанатомічного розтину явних відмінностей між дослідними та контрольною групами не виявлено. Розміщення внутрішніх органів правильне, просвіт трахеї та бронхів вільний, тканина легень блідо-рожевого кольору, капсула нирок легко знімалася, мозкова і кіркова речовина добре помітні на розрізі. Важливо віділити, що при патологоанатомічному розтині тканин шлунку мишей, яким задавали Фагомаст, не виявили жодних запальних процесів ні на зовнішній, ні на внутрішній поверхні.

При багаторазовому введенні тваринам препарату Фагомаст протягом 14 діб змін з боку серцево-судинної, дихальної, травної, сечовидільної систем не встановлено. Всі інші морфологічні показники периферичної крові у дослідних мишей знаходилися в межах фізіологічної норми упродовж усього терміну експерименту.

Встановлено, що за концентрації фагів від 10^4 до 10^9 БУО/см³ у препараті зміни рухової активності та патологічних відхилень у клітинах інфузорій не спостерігається. За встановленими ознаками препарат Фагомаст віднесено до IV класу (малотоксичні) безпечності. Протягом 12 місяців зберігання дослідних зразків препарату Фагомаст за температури від +2 до +6 °C не відбувається зниження титру, зміни рН та стерильності.

При визначенні фармакологічної ефективності при застосуванні препарату Фагомаст залежно від вмісту діючої речовини встановлено, що при введенні інтрацистернально коровам за субклінічного маститу препарату з вмістом 10^7 , 10^8 , 10^9 БУО/см³ два рази на добу, титр бактеріофагів залишається на рівні 10^6 БУО/см³ протягом всього періоду лікування. При введенні препарату здоровим тваринам не спостерігається збільшення кількості соматичних клітин в молоці.

При клінічних випробуваннях встановлено, що введення здоровим тваринам Фагомасту не впливає на гематологічні та біохімічні показники крові, та не спричинює видимих клініко-патологічних змін. При застосуванні Фагомасту коровам за маститу відмічається відновлення показників крові до

фізіологічних значень упродовж 5 днів. При цьому динаміка змін морфологічних і біохімічних показників крові у тварин, яким застосовували бактеріофаг, була практично аналогічна, як у корів, яких лікували антибіотиками, різниця між показниками не була вірогідна.

Фармакотерапевтична ефективність застосування Фагомасту при лікуванні корів за субклінічного маститу становила 92,1%, при цьому *S. aureus* через 5 днів після завершення лікування не виділявся, а кількість соматичних клітин знижувалася у 16,8 раза до $250,1 \pm 22,3$ тис./см³. Фармакологічна ефективність терапії при клінічній формі становила 71,4%. Препарат Фагомаст не поступається традиційним методам лікування із застосуванням антибіотиків. Водночас період часу, протягом якого відбувається вибракування молока за лікування маститу Фагомастом, у середньому в 1,5 раза ($p < 0,05$) менший, ніж за лікування препаратами з вмістом антибіотиків. Проведені дослідження підтверджують високу фармакотерапевтичну ефективність розробленого нами препарату бактеріофагу для лікування маститу у корів та дозволять підвищити екологічність отриманої продукції і мінімізувати обмежувальні заходи щодо випуску продукції при використанні антибактеріальних засобів.

Розроблено методологію виділення та дослідження властивостей штамів бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах. До того ж, досліджено вплив на фармаколітичну активність фізико-хімічних чинників при створенні препарату високолітичного штаму бактеріофагу *Phage SAvB14*. Встановлено, що *Phage SAvB14* проявляє високу фармаколітичну активність щодо *Staphylococcus aureus var. bovis*, утворює прозорі з чіткими краями бляшки розміром 1–2 мм, стійкій до впливу високих температур, хлороформу та коливань рН середовища, має короткий латентний період із формуванням високого титру нових віріонів.

Phage SAvB14 володіє високою антимікробною дією відносно зрілих біоплівкових бактерій, що дає можливість його застосування при хронічних стафілококових інфекціях, спричинених *S. aureus var. bovis*. Крім того, для

знищення біоплівки *S. aureus var. bovis* можна використовувати *Phage SAvB14* в комплексі з антибіотиками. Найкращий синергічний ефект взаємодії *Phage SAvB14* з антибіотиками спостерігається за їх поетапного застосування (спочатку бактеріофаг, потім антибіотик). При одночасному застосуванні *Phage SAvB14* з гентаміцином кількість життєздатних стафілококів у біоплівці зменшується в 39,8 рази ($p < 0,05$), а при поетапному – не виділяються взагалі. За одночасного впливу на стафілококові біоплівки *Phage SAvB14* та тетрацикліну не спостерігається синергічного ефекту, водночас при поетапному внесенні *Phage SAvB14* та антибіотику проявляється виражений бактерицидний ефект – кількість бактерій була у 6,31 рази ($p < 0,05$) меншою, ніж за одночасного застосування. Під час терапії маститу можна використовувати *Phage SAvB14* з антибіотиками, однак доцільне введення фагу, а потім через певний час антибіотику.

Визначено, що інтенсивність фармакологічно-літичної активності фагів залежала від кількості чутливих бактеріальних клітин у об'єкті живильного середовища. Через 12 годин впливу *Phage SAvB14* з титром 10^{-8} БУО/см³ на *S. aureus var. bovis* з вмістом 10^5 КУО/см³, кількість бактерій зменшилася у 1,5 рази ($p < 0,05$), порівняно з дією фагу 10^{-11} БУО/см³. Упродовж 24 год контакту фагу з клітинами *S. aureus var. bovis* у суспензії кількість бактерій зменшилася до $7,8 \pm 0,3 \cdot 10^2$ КУО/см³. Для отримання ефективної фармакологічної дії після застосування Фагомасту під час лікування корів за маститу, спричиненого *S. aureus var. bovis*, рекомендується використовувати фаголізат із титром не менше 10^{-7} БУО/см³.

Для ефективної фагової терапії потрібно враховувати біологічне походження штамів стафілококів і відповідно використовувати бактеріофаги, які є специфічними для своїх господарів. Так, *Phage SAvB14* лізує $92,7 \pm 8,3$ % культур золотистого стафілококу, виділеного з секрету молочної залози корів. Водночас він не впливає на культури золотистого стафілококу виділеного з біотопу людини. Фаг *Phage SAvB14* здатний інфікувати від $48,7 \pm 4,3$ % до $62,1 \pm 4,8$ % такі види стафілококів, як *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S.*

saprophyticus та *S. xylosus*, що свідчить про його полівалентність. В якості додаткового господаря для його реплікації можна використовувати *S. xylosus*, який є непатогенним. Встановлено, що фармакологічно-літична активність промислових фагових препаратів «Інтестіфал» та «Стафілококовий бактеріофаг» спрямована, в основному на *S. aureus var. hominis*. Промислові бактеріофаги взагалі не лізують культури, які виділені від корів хворих маститом.

Встановлено, що біоплівкоутворюючі штами збудників маститу стійкіші до антибактеріальних препаратів, ніж їх планктонні форми. Мінімальна бактерицидна концентрація антибіотиків для знищення бактерій у біоплівці у 7,5 разів ($p < 0,05$) вища, ніж для знищення їх планктонних форм. Найефективнішими щодо біоплівкових форм бактерій виявилися антибіотики енрофлоксацин, цефтріаксон і доксициклін, які практично повністю знищували бактерії у біоплівках. Водночас, після дії антибіотиків пеніцилінів, аміноглікозидів і макролідів кількість бактерій, що вижили становила близько $5,3 \text{ Ig КУО/см}^2$ площі біоплівки. Виявлено, що найвища чутливість планктонних бактерій збудників маститу (стрептококів і стафілококів) була до цефтріаксону і доксицикліну (100 – 80,9 %), а найменша до бензилпеніциліну (32,3 – 45,4 %). З досліджених 25 протимаститних внутрішньощистернальних препаратів лише 27,3 % проявляли бактерицидну дію до усіх виділених культур *S. aureus* і *S. agalactiae*. До 22,7 % препаратів патогенні бактерії виявилися взагалі не чутливі, а решти препаратів чутливими були від 14,3 до 83,3 % виділених патогенів. Відсоток штамів *S. aureus* на молочних фермах, стійких до метициліну становить, в середньому 26,8 %. Отже, встановлено, що *S. aureus* – збудник маститу стійкіший до антимікробних препаратів, ніж стрептококи, власне, це підтверджує низьку ефективність лікувальних заходів за виникнення маститу. Крім того, стафілококи, які циркулюють на молочних фермах, являють собою великий резервуар генів резистентності до антимікробних препаратів, які можуть передаватися людям. Власне це

визначило необхідність пошуку нових засобів для лікування стафілококових інфекцій тварин.

Ключові слова: бактеріофаговий препарат Фагомаст, антибіотики і антибактеріальні протимаститні препарати, фармако-токсикологічна оцінка Фагомасту, літична активність фагів, *Phage* фаг *SAvB14*, *Staphylococcus aureus variant bovis*, збудники маститу.

ANNOTATION

Horiuk Y.V. Justification, development and use of bacteriophage for the treatment of cows suffering from mastitis. On manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Veterinary Sciences in the specialty 16.00.04 – veterinary pharmacology and toxicology. Higher educational institution «Podillia State University». Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Lviv, 2023.

The development of effective and environmentally safe pharmacological drugs for the treatment of cows with mastitis, which actively act against antibiotic-resistant strains of bacteria, is still relevant. *Staphylococcus aureus* is the main causative agent of bovine mastitis worldwide. A feature of staphylococcal mastitis is the high risk of transmission of *S. aureus* between animals and the ability of the pathogen to persist in the udder of cows in the form of a subclinical infection. Since *S. aureus* is usually highly resistant to antibiotics and is virtually impossible to eradicate, all antibiotic therapy becomes subinhibitory and the pathogen becomes even more resistant to antibiotics. The fact that every use of antimicrobials contributes to the emergence of resistance to bacterial isolates calls for a general reduction in the use of antimicrobials in human and veterinary medicine. This highlights the need for alternative solutions for the treatment of bacterial infections, including the treatment of mastitis.

Currently, researchers do not pay enough attention to the possibility of using specific bacteriophages that circulate directly on dairy farms in Ukraine. This especially applies to such a disease as subclinical mastitis of cows, which causes

significant economic losses due to the development of antibiotic resistance in pathogens and the need to reject milk.

The dissertation is aimed at the theoretical and experimental justification of the development of a phage drug lytic to the causative agent of bovine mastitis *S. aureus variant bovis* and its comprehensive pharmaco-toxicological evaluation. The pharmacodynamics and biotechnological approaches to drugs based on bacteriophages, specific for causative agents of bovine mastitis, have been determined. The intracisternal drug Fagomast has been developed, the active ingredient of which is the highly lytic *Phage SAvB14* with a titer of at least 10^7 PFU/cm³, which lyses the causative agent of bovine mastitis, *S. aureus var. bovis*. This drug can be used as an alternative to antibiotics, provided that environmentally safe milk is obtained.

When determining the safety indicators of the drug Fagomast, it has been established that the acute toxicity of Fagomast is that its DL₅₀ is more than 5000 mg/kg of live animal weight. Also, no cumulative effect on the organism of laboratory animals has been established, since no visible macroscopic changes in the internal organs have been detected during the pathological autopsy after euthanasia of mice. The study of the irritant effect of the drug Fagomast has not revealed any visible changes in the epidermis of experimental animals. In addition, solutions of the drug Fagomast did not affect the behavior of animals in the experimental group.

During the study of the sensitizing effect of the drug Fagomast, it has been found that in the first minutes after the application of the drug, the animals tried to lick it, then their behavior did not differ from the usual. No changes have been detected on the surface of the skin for 2 hours. Examination of skin areas with application of Fagomast solutions has not revealed any pathological clinical signs. Therefore, the drug Fagomast does not cause an irritating or sensitizing effect. The study of the skin-resorptive properties of the drug Fagomast has not revealed clinical signs of toxicity, as indicated by the results of the research – all mice have remained alive with preservation of appetite and adequate behavior.

In addition, it has been established that the drug Fagomast, even in the maximum dose, do not cause changes in the general condition, work of the cardiovascular, respiratory, digestive, nervous and urinary systems. No obvious differences between the experimental and control groups have been found during the post-mortem examination. The placement of internal organs is correct, the lumen of the trachea and bronchi is free, the lung tissue is pale pink in color, the kidney capsule is easily removed, the brain and cortical substance are clearly visible on the section. It is important to highlight that during the pathological autopsy of the stomach tissues of mice that have been given Fagomast, no inflammatory processes have been found either on the outer or inner surface.

No changes in the cardiovascular, respiratory, digestive, or urinary systems have been observed during repeated administration of Fagomast to animals for 14 days. All other morphological indicators of peripheral blood in experimental mice have been within the physiological norm throughout the entire duration of the experiment.

It has been established that at the concentration of phages from 10^4 to 10^9 PFU/cm³ in the drug, no changes in motor activity and pathological abnormalities in the cells of the ciliates are observed. According to the established signs, the drug Fagomast is assigned to IV class (low-toxic) of safety. During 12 months of storage of Fagomast test samples at temperatures from +2 to -6 °C, there is no decrease in titer, no change in pH, and sterility.

When determining the pharmacological effectiveness when using the drug Fagomast, depending on the content of the active substance, it has been established that when the drug with a content of 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} PFU/cm³ is administered intracisternally to cows with subclinical mastitis twice a day, the bacteriophage titer remains at the level 10^{-6} PFU/cm³ during the entire treatment period. When the drug is administered to healthy animals, no increase in the number of somatic cells in milk is observed.

In clinical trials, it has been established that administration of Fagomast to healthy animals does not affect hematological and biochemical indicators of blood.

and does not cause visible clinical and pathological changes. When Fagomast is applied to cows with mastitis, blood parameters return to physiological values within 5 days. At the same time, the dynamics of changes in morphological and biochemical indicators of blood in animals treated with bacteriophage has been practically the same as in cows treated with antibiotics, the difference between indicators has been unlikely.

The pharmacotherapeutic effectiveness of the use of Fagomast in the treatment of cows with subclinical mastitis was 92.1 %, while *S. aureus* was not isolated 5 days after the end of treatment, and the number of somatic cells decreased by 16.8 times to 250.1 ± 22.3 ths/cm³. The pharmacological effectiveness of therapy in the clinical form was 71.4 %. The drug Fagomast is not inferior to traditional methods of treatment with the use of antibiotics. At the same time, the period of time during which milk is culled during mastitis treatment with Fagomast is on average 1.5 times ($p < 0.05$) shorter than during treatment with antibiotics. The conducted studies confirm the high pharmacotherapeutic effectiveness of the bacteriophage drug developed by us for the treatment of mastitis in cows and will allow to increase the environmental friendliness of the obtained products and minimize restrictive measures regarding the production of drugs when using antibacterial agents.

A methodology for the selection and investigation of the properties of bacteriophage strains circulating on dairy farms has been developed. In addition, the influence of physicochemical factors on the pharmacolytic activity during the preparation of the highly lytic strain of bacteriophage *Phage SAvB14* has been investigated. It has been established that *Phage SAvB14* exhibits high pharmacolytic activity against *Staphylococcus aureus var. bovis*, forms transparent plaques with clear edges 1–2 mm in size, is resistant to high temperatures, chloroform and fluctuations in the pH of the environment, has a short latent period with the formation of a high titer of new virions.

Phage SAvB14 has a high antimicrobial effect against mature biofilm bacteria, which makes it possible to use it in chronic staphylococcal infections caused by *S. aureus var. bovis*. In addition, to destroy the biofilm of *S. aureus var. bovis*, *Phage*

SAvB14 can be used in combination with antibiotics. The best synergistic effect of the interaction of *Phage SAvB14* with antibiotics is observed when they are used in stages (first the bacteriophage, then the antibiotic). With the simultaneous use of *Phage SAvB14* with Gentamicin, the number of viable staphylococci in the biofilm decreases by 39.8 times ($p < 0.05$), and with stepwise application, they are not released at all. During simultaneous exposure to staphylococcal biofilms, *Phage SAvB14* and Tetracycline do not have a synergistic effect, while at the same time, when *Phage SAvB14* and the antibiotic are applied in stages, a pronounced bactericidal effect is manifested – the number of bacteria was 6.31 times ($p < 0.05$) less than when they were used simultaneously. *Phage SAvB14* can be used with antibiotics during mastitis therapy, but it is advisable to introduce the phage and then, after a certain time, the antibiotic. It has been determined that the intensity of pharmacological and lytic activity of phages depended on the number of sensitive bacterial cells in the volume of the nutrient medium. After 12 hours of exposure to *Phage SAvB14* with a titer of 10^8 PFU/cm³ on *S. aureus var. bovis* with a content of 105 CFU/cm³, the number of bacteria decreased by 1.5 times ($p < 0.05$), compared to the effect of phage 10^6 PFU/cm³. During 24 hours of phage contact with cells of *S. aureus var. bovis* in the suspension, the number of bacteria decreased to $7.8 \pm 0.3 \cdot 10^2$ CFU/cm³. To obtain an effective pharmacological action after the use of Fagomast during the treatment of cows for mastitis caused by *S. aureus var. bovis*, it is recommended to use a phagolysate with a titer of at least 10^7 PFU/cm³.

For effective phage therapy, it is necessary to take into account the biological origin of staphylococcal strains and, accordingly, use bacteriophages that are specific for their hosts. Thus, *Phage SAvB14* lyses 92.7 ± 8.3 % of cultures of *Staphylococcus aureus* isolated from the secretion of the mammary gland of cows. At the same time, it does not affect cultures of *Staphylococcus aureus* isolated from the human habitat. *Phage SAvB14* is able to infect from 48.7 ± 4.3 % to 62.1 ± 4.8 % of staphylococcal species such as *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* and *S. xylosum*, which indicates its polyvalency. *S. xylosum*, which is non-pathogenic, can be used as an additional host for its replication. It has been established that the

pharmacological and lytic activity of industrial phage agents “Intestiphage” and “Staphylococcal bacteriophage” is aimed mainly at *S. aureus var. hominis*. Industrial bacteriophages generally do not lyse cultures isolated from cows with mastitis.

It has been established that film-forming strains of mastitis pathogens are more resistant to antibacterial drugs than their planktonic forms. The minimum bactericidal concentration of antibiotics for destroying bacteria in a biofilm is 7.5 times ($p < 0.05$) higher than for destroying their planktonic forms. Antibiotics enrofloxacin, ceftriaxone and doxycycline have proved to be the most effective against biofilm forms of bacteria, which almost completely destroyed bacteria in biofilms. At the same time, after the action of antibiotics penicillins, aminoglycosides and macrolides, the number of surviving bacteria was about $5.3 \lg \text{CFU/cm}^2$ of biofilm area. It has been found that the highest sensitivity of planktonic bacteria causing mastitis (streptococci and staphylococci) was to ceftriaxone and doxycycline (100 – 80.9 %), and the lowest to benzylpenicillin (32.3 – 45.4 %). Only 27.3 % of the studied 25 anti-mastitis intracisternal drugs has showed a bactericidal effect against all isolated cultures of *S. aureus* and *S. agalactiae*. Pathogenic bacteria have not been at all sensitive to 22.7 % of the drugs, and 14.3 to 83.3 % of the isolated pathogens have been sensitive to the rest of the drugs. The percentage of *S. aureus* strains on dairy farms that are resistant to methicillin is, on average, 26.8 %. So, it has been established that *S. aureus*, the causative agent of mastitis, is more resistant to antimicrobial drugs than streptococci, in fact, this confirms the low effectiveness of treatment measures for the occurrence of mastitis. In addition, staphylococci circulating on dairy farms represent a large reservoir of antimicrobial resistance genes that can be transmitted to humans. This actually has determined the need to find new means for the treatment of staphylococcal infections in animals.

Key words: bacteriophage drug Fagomast, antibiotics and antibacterial anti-mastitis drugs, pharmaco-toxicological evaluation of Fagomast, lytic activity of phages, *Phage SAvB14*, *Staphylococcus aureus variant bovis*, causative agents of mastitis.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**Статті у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України**

1. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Perkiy Y.B., Horiuk V.V. Resistance of the main pathogens of mastitis of cows to modern antimicrobial drugs. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*. 2018. Vol. 6 (2). P. 49–53. (Здобувачкою проведено визначення чутливості до антибактеріальних речовин основних збудників маститу у корів та підготовлено матеріали до друку).
2. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Perkiy Y.B., Horiuk V.V. Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2018. Vol. 20 (83). P. 115–119. Doi: <https://doi.org/10.15421/nvlvet8322> (Здобувачкою проведено вивчення поширення основних збудників маститу у корів та підготовлено матеріали до друку).
3. Horiuk Y.V. Fagothrapy of cows mastitis as an alternative to antibiotics in the system of obtaining environmentally safe milk. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2018. Vol. 20 (88). P. 42–47. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet8807>
4. Horiuk Y. Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2019. Vol. 21 (94). P. 115–120. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9421>
5. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Horiuk V.V., Mzyk V.P. Effect of Temperature on the lytic activity of Bacteriophage *Phage SAvB14*, specific for *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*. 2019. Vol. 4. P. 37–40. Doi:

<https://doi.org/10.31890/vttp.2019.04.07> (Здобувачкою проведено визначення впливу температури на літичну активність Phage SAvB14, проаналізовано отримані дані та підготовлено роботу до друку).

6. Horiuk Y.V. Isolation of bacteriophages specific for *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2019. Vol. 7(3). P. 143–146. Doi: <https://doi.org/10.32819/2019.71025>

7. Horiuk Y. Characterization of the biological properties of bacteriophages *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 2019. Vol. 21(96). P. 47–52. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9608>

8. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M., Salata V., Horiuk V. Species composition and methicillin resistance of staphylococci taken on dairy farms. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2020. Vol. 22(97). P. 13–19. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9703> (Здобувачкою проведено визначення поширення метицилінрезистентних стафілококів на молочних фермах, проаналізовано отримані результати та підготовлено матеріали до друку).

9. Horiuk Y.V. The effect of various titers of bacteriophages on the amount of *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*. 2020. Vol. 5. P. 26–31. Doi: <https://doi.org/10.31890/vttp.2020.05.05>

10. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M., Kovalenko V., Mizyk V. (2021). Toxicological evaluation of the drug "Fagomast" for the treatment of mastitis in cows. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*. 2021. Vol. 7. P. 29–34. Doi: <https://doi.org/10.31890/vttp.2021.07.04> (Здобувачкою проведено токсикологічну оцінку препарату Фагомаст та підготовлено матеріали до друку).

11. Kukhtyn M., **Horiuk Y.**, Salata V., Klymyk V., Vorozhbit N., Rushchinskaya T. *Staphylococcus aureus* of raw cow's milk. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series:*

Veterinary Sciences. 2021. Vol. 23(102). P. 53–59. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10208> (Здобувачка брала участь у лабораторних дослідженнях щодо визначення поширення *S. aureus* у середовищі молочних ферм та підготовці матеріалів до друку).

12. Горюк Ю., Кухтин М., Горюк В., Просяний С. Динаміка морфологічних та біохімічних показників крові корів хворих маститом при застосуванні фагового препарату Фагомаст. *Аграрний вісник Причорномор'я*. 2021. № 100. С. 44–51. Doi: <https://doi.org/10.37000/abbsl.2021.100.09> (Здобувачкою проведено відбір крові корів, хворих маститом, проаналізовано отримані результати та підготовлено роботу до друку).

13. Горюк Ю.В. Терапевтична ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст для лікування субклінічного маститу корів. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2021. №3. С. 204–209. Doi: <https://doi.org/10.31210/visnyk2021.03.25>

14. Горюк Ю.В. Визначення ефективності застосування препарату Фагомаст з різними титрами Phage SAvB14. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2021. №2 С. 57–64. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-168-2-57-64>

15. Горюк Ю.В., Кухтин М.Д., Горюк В.В., Мізик В.П. Вплив препарату Фагомаст на життєдіяльність інфузорій та слизову оболонку очей кроликів. *Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка*. 2022. №35. С. 55–62. Doi: <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2021-2-7> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, їх аналізі та написанні статті).

16. Horiuk Y. Therapeutic efficacy of bacteriophage drug Fagomast in clinical mastitis of cows. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*. 2022. Vol. 24(105). P. 89–93. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10513>

Статті у періодичних виданнях, включених до категорії «А» Переліку наукових фахових видань України, або у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus

17. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Strayskyu Y.S., Havrylianchyk R.Y., Horiuk V.V., Fotina H.A. Comparison of the minimum bactericidal concentration of antibiotics on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*: mastitis causative agents. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. Vol. 9(6). P. 616–622. (Здобувачкою проведено визначення МБК антибактеріальних речовин щодо планктонних та біоплівкових форм *S. aureus* та підготовлено матеріали до друку).

18. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M., Kovalenko V., Kornienko L., Horiuk V., Liniichuk N. Biofilm formation in bovine mastitis pathogens and the effect on them of antimicrobial drugs. *Independent Journal of Management & Production*. 2019. Vol. 10(7). P. 897–910. Doi: <https://doi.org/10.14807/ijmp.v10i7.1012> (Здобувачкою проведено визначення біоплівкоутворюючих властивостей основних збудників маститу у корів, вплив на них антибіотиків та підготовлено матеріали до друку).

19. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Stravskyu Y.S., Klymnyuk S.I., Vergeles K.M., Horiuk V.V. Influence of staphylococcal *Phage SAvB14* on biofilms, formed by *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10(3). P. 314–318. Doi: <https://doi.org/10.15421/021948> (Здобувачкою проведено визначення впливу бактеріофагу на біоплівки *S. aureus*, виділеного від корів, хворих на мастит, та підготовлено матеріали до друку).

20. **Horiuk Y.**, Horiuk V., Kukhtyn M., Tsvihun A., Kernychnyi S. Characterization of lytic activity of *Phage SAvB14* on *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2020. Vol. 7(3). P. 509–516. Doi: <http://doi.org/10.5455/javar.2020.g447> (Здобувачкою проведено визначення літичних властивостей *Phage SAvB14* щодо *S. aureus*

var. bovis залежно від кількості бактерій та підготовлено матеріали до друку).

21. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M., Horiuk V., Kernychnyi S., Tarasenko L. Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Veterinárni Medicína*. 2020. Vol. 65(10). P. 421–426. Doi: <https://doi.org/10.17221/55/2020-VETMED> (Здобувачкою виділено та описано бактеріофаги, які циркулюють на молочних фермах, та підготовлено матеріали до друку).

22. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M., Kernychnyi S., Laiter-Moskaliuk S., Prosyanyi S., Boltyk N. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* cultures of different biological origin to commercial bacteriophages and phages of *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Veterinary World*. 2021. Vol. 14(6). P. 1588–1593. Doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.1588-1593 (Здобувачкою проведено визначення впливу на стафілококи різного біологічного походження препаратів бактеріофагів промислового виробництва та бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах та підготовлено матеріали до друку).

23. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Horiuk V.V., Sytnik V.A., Dashkovskyy O.O. Effect of *Phage SAvB14* combined with antibiotics on *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. Vol. 12(3). P. 531–536. Doi: <https://doi.org/10.15421/022173> (Здобувачкою проведено визначення впливу на біоплівкові форми *S. aureus* var. *bovis* бактеріофагу *Phage SAvB14* в комплексі з антибіотиками та підготовлено матеріали до друку).

Патенти України на корисну модель

24. **Горюк Ю. В.**, Кухтин М. Д., Горюк В. В. Бактеріофаг phage SAvS_14 для ветеринарної мікробіології; пат. 139981 Україна: МПК 20.01 C12N 7/00 A61K 35/76 (2015.01) A61P 31/04 (2006.01). № u 2019 03079; заявл. 28.03.2019; опубл. 10.02.2020, Бюл. №3. (Здобувачка брала безпосередню участь у

лабораторних дослідженнях, підготовці та поданні матеріалів до патентування).

25. **Горюк Ю. В.**, Кухтин М. Д., Горюк В. В., Бейко Л. А. Штам *Staphylococcus aureus var. bovis* 1491 Г для ветеринарної мікробіології: пат. 137461 Україна: МПК (1901.01) C12N 1/00. № u 2019 03065; заявл. 28.03.2019; опубл. 25.10.2019, Бюл. №20. *(Здобувачка брала безпосередню участь у лабораторних дослідженнях, підготовці та поданні матеріалів до патентування).*

Технічні умови України

26. **Горюк Ю.**, Кухтин М. Технічні умови ТУ У 21.2–22769675–001:2022 Препарат ветеринарний Фагомаст. Кам'янець-Подільський, 2022. 18 с. *(Здобувачка брала участь у розробці рецептури препарату, організації і проведенні експериментальних досліджень, підготовці відповідної документації).*

Методичні рекомендації:

27. **Горюк Ю. В.**, Кухтин М. Д. Виділення бактеріофагів *S. aureus var. bovis* на молочних фермах та визначення їх літичної активності. Методичні рекомендації. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2022. 18 с. *(Здобувачка провела експериментальні дослідження, аналіз отриманих результатів та оформила методичні рекомендації).*

28. **Горюк Ю. В.**, Кухтин М. Д. Лікування корів за маститу з використанням бактеріофагового препарату Фагомаст. Методичні рекомендації. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2022. 18 с. *(Здобувачка провела клінічні дослідження, аналіз отриманих результатів та оформила методичні рекомендації).*

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації

29. **Горюк Ю.В.**, Кухтин М.Д. Використання бактеріофагів при органічному виробництві молока. *Органічне виробництво і продовольча безпека*. Збірник наукових праць VII Міжнародної науково-практичної конференції, 23-24 травня 2019 р. Житомир, 2019. С. 24–27.

30. **Горюк Ю.В.**, Горюк В.В. Використання бактеріофагів при лікуванні маституу корів. *Аграрна наука та освіта в умовах Євроінтеграції*. Збірник наукових праць міжнародної науково-практичної конференції, 20-21 березня 2019 р. Тернопіль, 2019. С. 309–311.

31. **Горюк Ю.**, Горюк В. Перспективи використання бактеріофагів в якості біоконтролю золотистого стафілококу в молоці. *Стан і перспективи харчової науки та промисловості*. Збірник тез доповідей V міжнародної науково-технічної конференції, 10-11 жовтня 2019 р. Тернопіль, 2019. С. 70–71.

32. **Horiuk Y.** Influence of pH on lytic activity of Phage SAvB14. *About the problems of science and practice, tasks and ways to solve them*. Abstracts of VI International Scientific and Practical Conference, October 26-30, 2020. Milan, 2020. P. 592–594.

33. **Горюк Ю.В.**, Горюк В.В., Кухтин М.Д. Використання Phage SAvB14 для руйнування біоплівки *Staphylococcus aureus* variant bovis, як альтернатива хіміотерапевтичним засобам. *Наукові дослідження для органічного бізнесу. Тваринництво заради ґрунту» в рамках IV Міжнародного Конгресу Органічна Україна*. Збірник матеріалів Міжнародної науково-практичної конференції, 4 квітня 2020 р. Київ, 2020. С. 62–64.

34. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M. Main features of phage SAvB14 specific for *S. aureus* var. bovis. *Organization of scientific research in modern conditions 2020*. Conference proceedings, May 14-15, 2020. Washington, 2020. P. 244–247.

35. **Горюк Ю.**, Кухтин М. Д. Біоконтроль золотистого стафілокока у стічних водах молокопереробних підприємств. *Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти*. Тези доповідей

I Міжнародної науково-технічної конференції, 20–21 травня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 81–82.

36. Горюк Ю.В. Взаємодія бактеріофагу Phage SA ν B14 та чутливої до нього культури *S. aureus* var. *bovis*. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин*. Матеріали щоріч. наук.-практ. конф. молодих вчених, 30 червня 2021р. Київ, 2021. С. 6–7.

37. Горюк Ю.В. Характеристика бактеріофагів *Staphylococcus aureus* виділених на молочних фермах. *II конференція «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині» присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові»*. Тези доповідей, 18–19 листопада 2021 р. Львів, 2021. С. 45.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	25
ВСТУП	27
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	36
1.1. Ризики при використанні хіміотерапевтичних препаратів для лікування корів за маститу	36
1.2. Особливості фармакотерапії при стафілококовому маститі у корів	45
1.3. Альтернативні антибіотикам профілактичні та фармакотерапевтичні методи боротьби з стафілококовим маститом у корів	48
1.3.1. Використання пробіотичних препаратів для лікування і профілактики маститу у корів	51
1.3.2. Використання препаратів на основі ефірних олій у лікуванні та профілактиці маститу у корів	54
1.3.3. Використання вакцин, імуностимуляторів та антимікробних пептидів для профілактики маститу у корів	57
1.3.4. Антибактеріальні препарати при фармакотерапії маститу з наночастками, прополісом, йодом, хітозаном тощо	61
1.4. Фармакотерапевтичний потенціал бактеріофагів при боротьбі з маститом у корів	65
1.5. Основні вимоги при розробці препаратів на основі бактеріофагів для лікування маститу у корів	77
1.6. Фармакокінетика та фармакодинаміка бактеріофагів в організмі тварини	82
1.7. Підсумки з огляду літературних джерел	83
РОЗДІЛ 2. ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	86
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	102
3.1. Аналіз антибіотиків та протимаститних препаратів щодо впливу на збудники маститу	102

3.1.1. Поширення основних збудників маститу корів, в тому числі золотистого стафілококу, на молочних фермах	102
3.1.2. Вплив антибіотиків та внутрішньоцистернальних протимікробних препаратів на збудники маститу	114
3.1.3. Вплив антибіотиків на плівкоутворювальні бактерії збудники маститу	120
3.1.4. Визначення мінімальної бактерицидної концентрації антибіотиків щодо <i>S. aureus</i> , які перебувають у планктонній та біоплівковій формах	126
3.1.5. Аналіз метицилінрезистентності та біологічних властивостей стафілококів – господарів літичних бактеріофагів	131
3.2. Обґрунтування вибору діючої речовини для створення препарату на основі бактеріофагів	142
3.2.1. Вплив препаратів бактеріофагів на культури золотистого стафілококу різного біологічного походження	142
3.2.2. Передумови та підбір методики для створення протимаститного препарату специфічного щодо <i>Staphylococcus aureus variant bovis</i>	147
3.2.3. Виділення бактеріофагів та вплив на їх фармаколітичну активність фізико-хімічних чинників при створенні препарату	152
3.2.4. Фармаколітична дія різних титрів <i>Phage SAvB14</i> на кількість <i>Staphylococcus aureus variant bovis</i>	164
3.2.5. Інтенсивність фармаколітичної дії <i>Phage SAvB14</i> , залежно від кількості чутливих клітин	168
3.2.6. Фармаколітична активність виділених бактеріофагів <i>Staphylococcus aureus variant bovis</i> щодо культур золотистого стафілококу різного біологічного походження	172
3.2.7. Антимікробна дія бактеріофагу <i>Phage SAvB14</i> на біоплівки, сформовані <i>Staphylococcus aureus variant bovis</i>	176

3.2.8. Антимікробна дія бактеріофагу <i>Phage SAyB14</i> на біоплівки, сформовані <i>Staphylococcus aureus variant bovis</i> в комплексі з антибіотиками	182
3.3. Доклінічні дослідження новоствореного препарату Фагомаст на токсичність	189
3.3.1. Технологічні параметри виготовлення і контролю препарату на основі бактеріофагів для профілактики та лікування корів за маститу	189
3.3.2. Токсикологічна оцінка препарату Фагомаст для лікування корів за маститу	193
3.3.3. Вплив препарату Фагомаст на життєздатність інфузорій та слизову оболонку очей кроликів	199
3.4. Клінічні випробування новоствореного препарату Фагомаст і порівняльна характеристика з існуючими протимаститними препаратами	203
3.4.1. Фармакологічна ефективність застосування препарату Фагомаст залежно від вмісту діючої речовини	203
3.4.2. Динаміка морфологічних та біохімічних показників крові корів, хворих маститом, при застосуванні препарату Фагомаст	210
3.4.3. Вплив препарату Фагомаст на показники природної резистентності корів, хворих на мастит	217
3.4.4. Фармакотерапевтична ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст за субклінічного маститу у корів	218
3.4.5. Фармакотерапевтична ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст за клінічного маститу у корів	222
3.4.6. Визначення економічної ефективності лікування при застосуванні препарату Фагомаст	225
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	228
ВИСНОВКИ	265
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	270
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	271
ДОДАТКИ	342

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БЛРС	Бета-лактамази розширеного спектру
БУО	Бляшкоутворюючі одиниці
КУО	Колонієутворювальні одиниці
МСК	Мезенхімальні стовбурові клітини
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, (короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами)
DISARM	Defense island system associated with restriction-modification оборонна острівна система, пов'язана з обмеженням- модифікацією
EMA (ЄАЛЗ)	European Medicines Agency (Європейське агентство з лікарських засобів)
EPS	Extracellular polymeric substances (позаклітинні полімерні речовини)
fnbA	Фібронектин-зв'язуючий білок А
fnbB	Фібронектин-зв'язуючий білок Б
GMP	Good Manufacturing Practice (належна виробнича практика)
IgG	Імуноглобулін G
IL-6	цитокін інтерлейкіну-6
L.A- MRSA	Livestock-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (метицилін-резистентний <i>Staphylococcus aureus</i> , виділений від тварин)
MBC	Мінімальна бактерицидна концентрація
MIC	Мінімальна інгібуюча концентрація
MRSA	Метицилін стійкий <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Метицилін-чутливі штами <i>S. aureus</i>
NAHMS	National Animal Health Monitoring System (Національна система моніторингу здоров'я тварин)
NF-κB	Ядерний транскрипційний фактор NF-карра-В

PAS	Синергія фаг-антибіотик
RM	Система рестрикції-модифікації
TLRs	Toll-подібні рецептори
TNF- α	Цитокін фактору некрозу пухлини альфа
VRE	Ванкоміцин резистентний ентерокок

ВСТУП

Актуальність теми. Розробка ефективних та екологічно безпечних фармакологічних препаратів для лікування корів за маститу, які активно діють проти антибіотикостійких штамів бактерій, досі є актуальною [21, 266, 268, 466, 473]. Золотистий стафілокок вважається одним із основних збудників маститу корів у всьому світі [129, 506, 573]. Особливістю стафілококового маститу є високий ризик передачі *S. aureus* між тваринами та здатність збудника зберігатися у вимені корів у формі субклінічної інфекції [476, 556]. Важливими факторами вірулентності цього патогену є його здатність до адгезії, інкапсуляції на епітеліальних клітинах та утворенні біологічної плівки (біоплівки), яка перешкоджає лікуванню антимікробними препаратами та сприяє розвитку хронічної інфекції [248, 449]. Традиційне лікування стафілококового маститу у період лактації корів та у сухості вимагає застосування протимікробних засобів [472]. Ефективність фармакологічних антибактеріальних препаратів за маститу корів у сухостійний період досягає 78 % [413, 445], у той же час ефективність застосування цих самих препаратів у період лактації значно нижча і сягає лише 20 – 40 % [556]. Крім того, прослідковується значна стійкість золотистого стафілококу до більшості антибіотиків. Зокрема, культури *S. aureus*, виділені від великої рогатої худоби, хворої на мастит, були стійкі до цефокситину (75 %), цефтазидиму (75 %), амоксициліну (71,4 %), цефотаксиму (67,8 %), цефепіму (66,1 %), оксациліну (64,3 %), норфлуксацину (60,7 %) і гентаміцину (58,9 %). Загалом, штами золотистих стафілококів проявляли стійкість принаймні до 1 з 10 антимікробних препаратів [67, 69, 128]. Враховуючи те, що кожне застосування антимікробних препаратів сприяє виникненню резистентності бактеріальних ізолятів, а це в свою чергу вимагає загального скорочення використання антибіотиків у гуманній та ветеринарній медицині [18]. Власне, це підкреслює необхідність альтернативних рішень для лікування бактеріальних інфекцій, включаючи лікування маститу.

Однією із запропонованих альтернатив щодо заміни антибіотиків у лікуванні корів за маститу може бути фаготерапія [42, 429]. Бактеріофаги – це природні віруси, які проявляють високу специфічність до бактеріального хазяїна [84, 493, 581]. Фаг інфікує бактерію, вводячи свій генетичний матеріал через клітинну стінку та мембрану, в результаті чого метаболізм господаря перенаправляється для швидкої реплікації фагів. До завершальної стадії циклу реплікації бактеріофагів ендолізину, кодовані фагом, впливають на клітинну стінку бактерії зсередини, що призводить до вивільнення фагового потомства і знищення патогену [90, 431]. Глобальне зацікавлення до терапії фагами проявляється у зростаючій кількості останніх клінічних випробувань із застосуванням перорального, внутрішньовенного або місцевого застосування фагів [37, 42, 417, 420].

Низька ефективність антибіотикотерапії за субклінічної форми маститу у корів ще пояснюється здатністю збудників формувати шільні біоплівки [18, 248, 511]. Властиво тому, дія антибактеріальних препаратів має бути направлена на руйнування мікробних плівок або здатності препарату проникати у матрикс і впливати на збудники маститу.

Останнім часом багато вчених висловлюють думку, що з екологічних і фізіологічних причин бактеріофаги, ймовірно, будуть ефективнішими, ніж антибіотики в знищенні бактерій у біоплівці [115, 118, 568]. Вплив фагів на біоплівки включає початкову стадію бактеріальної адсорбції, за якою рухається бактеріальна інфекція. Зараження фагом призводить до загибелі чутливих бактерій та до їх лізису. Видалення біоплівкових бактерій за допомогою лізису призводить до фізіологічних змін серед бактерій у глибоких шарах біоплівки, що дозволяє цим бактеріям ефективніше підтримувати подальшу інфекцію фагів [91, 515].

Значна кількість фагів мають здатність продукувати полісахаридні деполімерази і за цих умов розвитку фагової інфекції ензими розкладають капсульні полісахариди (*CPSs*), *O*-полісахаридні ланцюги ліпополісахаридних (*LPS*) молекул або позаклітинні полісахариди (*EPSs*), які утворюють матрицю

біоплівки [97]. Власне, тому за розробки фагових препаратів, особливо для лікування хронічних захворювань таких, як субклінічний мастит, необхідно виділяти і культивувати літичноактивні фаги з високою деполімеразною активністю ензимів.

На даний час дослідники недостатньо звертають увагу на можливість використання специфічних бактеріофагів, які циркулюють безпосередньо на молочних фермах в Україні. Особливо це стосується такого захворювання, як субклінічний мастит корів, який завдає значні економічні збитки через розвиток антибіотикорезистентності у збудників та необхідністю бракування молока. Властиво тому, розробка ефективних, екологічно безпечних та економічно вигідних методів і фармакологічних препаратів для лікування корів за розвитку маститу із застосуванням специфічного бактеріофагу відносно основного збудника *S. aureus var. bovis* визначила основний напрям дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в Подільському державному аграрно-технічному університеті (нині Заклад вищої освіти «Подільський державний університет») на факультеті ветеринарної медицини і технологій у тваринництві за ініціативною тематикою «Теоретичне та експериментальне обґрунтування впливу бактеріофагів на планктонні та біоплівкові форми бактерій у системі одержання екологічно безпечного молока», номер державної реєстрації 0119U001356.

Мета та завдання досліджень. Метою роботи було теоретично та експериментально обґрунтувати розробку фагового препарату, літичного до збудника маститу корів *S. aureus variant bovis* та провести його комплексну фармако-токсикологічну оцінку.

Для реалізації мети досліджень необхідно виконати наступні завдання:

проаналізувати застосування фармакологічних засобів для лікування корів за маститу та визначити чутливість виділених збудників до антибактеріальних препаратів;

дослідити біоплівкоутворювальні властивості основних збудників маститу, визначити вплив на них антибактеріальних препаратів та стійкість до метициліну;

- провести визначення мінімальної бактерицидної концентрації антибіотиків щодо *S. aureus*, які перебувають у планктонній та біоплівковій формах;

- провести виділення бактеріофагів для створення протимаститного препарату специфічного щодо *S. aureus var. bovis* та дослідити вплив фізико-хімічних чинників на літичну активність бактеріофагів;

- розробити технологічні параметри виготовлення та здійснити контроль дослідного препарату на основі бактеріофагу для профілактики та лікування корів за виникнення маститу;

- оцінити інтенсивність фармаколітичної дії *Phage SAvB14* перспективного для створення протимаститного препарату, залежно від кількості чутливих клітин;

- визначити фармаколітичну активність виділених бактеріофагів *Staphylococcus aureus variant bovis* щодо культур золотистого стафілококу різного біологічного походження;

дослідити вплив виділеного стафілококового бактеріофагу *Phage SAvB14* на біоплівки, сформовані *S. aureus var. bovis*, як самостійного антибактеріального агента та в комплексі з антибіотиками;

- провести фармакологічну та токсикологічну оцінку препарату Фагомаст для лікування корів за маститу та його вплив на життєздатність інфузорій та слизову оболонку очей кроликів;

- оцінити ефективність застосування препарату Фагомаст з різним титром *Phage SAvB14* за введення здоровим та хворим на субклінічну форму маститу корів;

вивчити динаміку морфологічних та біохімічних показників крові корів, хворих маститом, за застосування фагового препарату Фагомаст;

- визначити фармакологічну ефективність від застосування бактеріофагового препарату Фагомаст для лікування корів за субклінічного та клінічного маститу.

Об'єкт досліджень: протимаститні препарати, антибіотики, клінічні бактеріофаги, промислові бактеріофаги, фаговий препарат Фагомаст, токсичність, збудники маститу, золотистий стафілокок, корови хворі маститом, лікування маститу.

Предмет досліджень: фармако-токсикологічна оцінка розробленого фагового препарату, протимікробна ефективність внутрішньоцистернальних препаратів з антибіотиками щодо збудників маститу корів, літична ефективність фагових препаратів, фармакологічні підходи щодо виділення, ідентифікації та оцінки літичних фагів, активних щодо *S. aureus var. bovis*, гематологічні та біохімічні показники крові корів хворих маститом, мікробіологічні показники секрету молочної залози корів до і під час лікування.

Методи досліджень. Токсикологічні (визначення DL_{50}); фармакологічні (шкірно-резорбтивна, шкірно-подразнювальна, подразнювальна); мікробіологічні (виділення та ідентифікація збудників маститу, чутливість їх щодо лікувальних протимаститних препаратів, культуральні, тинкторіальні, морфологічні і біохімічні властивості у *S. aureus var. bovis*, виділення та нарощування титру стафілококових фагів, оцінка літичної активності фагів, вплив на біоплівки), гематологічні (кількість еритроцитів і лейкоцитів, лейкограма; вміст гемоглобіну, кількість соматичних клітин); біохімічні (концентрація глюкози, рівень загального протеїну, сечовини, холестеролу, креатиніну в сироватці крові, активність ензимів АсАТ, АлАТ, ЛФ, вміст Са і Р); клінічні (клінічний огляд); електронно-мікроскопічні (формування біоплівки), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше визначено фармакодинаміку та біотехнологічні підходи щодо препаратів на основі бактеріофагів, специфічних до збудників маститу корів. Розроблено внутрішньоцистенальний препарат Фагомаст для профілактики та лікування корів за маститу, як альтернативу антибіотикам за умови одержання екологічно безпечного молока.

Науково доведено, що DL_{50} Фагомасту становить більше 5000 мг/кг живої маси тварин. Препарат не володіє кумулятивними, сенсibiliзувальними властивостями, не викликає подразнення, нетоксичний при пероральному попаданні в живий організм та не впливає на зміну морфологічних показників крові лабораторних тварин. До того ж не спричиняє місцево подразнювальну дію на слизових оболонках очей кролика. Встановлено, що за концентрації фагів від 10^4 до 10^9 БУО/см³ у препараті зміни рухової активності та патологічних відхилень у клітинах інфузорій не виявлені. За встановленими фармакологічними ознаками препарат Фагомаст віднесено до IV класу (малотоксичні) безпечності.

Уперше розроблено методологію виділення та дослідження властивостей штамів бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах. До того ж виділено та досліджено біологічні властивості високолітичного штаму бактеріофагу *Phage SAvB14*. Встановлено, що *Phage SAvB14* проявляє високу літичну активність щодо *Staphylococcus aureus var. bovis*, утворює прозорі з чіткими краями бляшки розміром 1 – 2 мм, стійкий до впливу високих температур, хлороформу та коливань рН середовища, має короткий латентний період із формуванням високого титру нових віріонів. *Phage SAvB14* ефективно проникає у матрикс біоплівки та знищує плівкоутворювальні збудники маститу – *S. aureus var. bovis* та може бути використаний сукупно з антибіотиками. Штам бактеріофага *Phage SAvB14* первинно задепонований у колекції мікроорганізмів Національного центру штамів мікроорганізмів України за номером 737 (Свідоцтво на штам від 05.03.2019 року). Крім того, наукову новизну підтверджено деклараційним патентом України на корисну модель № 139981 «Бактеріофаг *phage SAvB14* для ветеринарної мікробіології».

Значно розширено та поглиблено знання щодо патогенних властивостей основних збудників маститу у корів на молочних фермах України. Встановлено, що серед збудників, як гострої, так і хронічної форм маститу найбільшою плівко- та токсиноутворювальною здатністю володіють штами *S. aureus*, крім того, вони є великим резервуаром генів резистентності до

антимікробних препаратів, у тому числі стійкості до метициліну, які в процесі одержання молока можуть його забруднювати та передаватися людям. Виявлено, що препарати на основі бактеріофагів промислового виробництва неефективні щодо культур золотистих стафілококів, виділених з молочних продуктів та від корів, хворих маститом.

Ідентифіковано та первинно задекларовано штам *Staphylococcus aureus* var. *bovis* 1491 f, який є типовим збудником маститу в корів (Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії ДНКІБІМ № 736 від 05.03.2019 року), наукова новизна підтверджена деклараційним патентом України на корисну модель № 137461 «Штам *Staphylococcus aureus* var. *bovis* 1491 f для ветеринарної мікробіології».

Практичне значення. Науково обгрунтовано та розроблено препарат Фагомаст на основі бактеріофагів для лікування корів за стафілококового маститу. Використання препарату Фагомаст на молочних фермах для лікування корів за виникнення маститу дозволило, з одного боку, ефективно ліквідувати основного збудника маститу золотистого стафілококу, з іншого, зменшити використання антибіотиків у молочному тваринництві. До того ж, попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників захворювання, потрапляння залишкових кількостей антибіотиків у молоко, що дозволяє одержувати екологічно безпечне молоко. Результати викладені в методичних рекомендаціях «Лікування корів за маститу з використанням бактеріофагового препарату Фагомаст», затверджені науково-методичною радою Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (протокол № 4 від 25.05.2022 року).

На основі проведених досліджень для профілактики та лікування корів за виникнення маститу різних форм запропоновано внутрішньоцистернальний препарат Фагомаст на основі бактеріофагу *Phage SAyB14*: технічні умови України 21.2–22769675–001:2022.

Впроваджені в практику методології виділення та дослідження бактеріофагів, які дозволяють забезпечити відбір виключно вірулентних штамів,

специфічних щодо *S. aureus var. bovis* – основного збудника маститу корів. Результати викладені в методичних рекомендаціях «Виділення бактеріофагів *S. aureus var. bovis* на молочних фермах та визначення їх літичної активності», затверджені науково-методичною радою Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (протокол № 4 від 25.05.2022 року).

Матеріали дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі для підготовки здобувачів вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» у закладах вищої освіти України.

Особистий внесок здобувача. Авторкою проведено патентний пошук, огляд літератури з обраної теми, розроблено програму та етапи наукових досліджень, сформульовано мету і завдання та відпрацьовано методики експериментальних досліджень. Проведено виробничі та лабораторні дослідження. Проаналізовано та узагальнено отримані наукові результати, написано статті, оформлено патенти, проведено статистичну обробку матеріалу і написання дисертації. За консультації доктора ветеринарних наук, професора Кухтина М.Д. обґрунтовано основні положення, висновки і пропозиції.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень за темою виконаної дисертаційної роботи доповідалися на: VII Міжнародній науково-практичній конференції «Органічне виробництво і продовольча безпека» (Житомир, 2019); Міжнародній науково-практичній конференції «Аграрна наука та освіта в умовах Євроінтеграції» (Кам'янець-Подільський, 2019); V Міжнародній науково-технічній конференції «Стан і перспективи харчової науки та промисловості» (Тернопіль, 2019); VI International Scientific and Practical Conference «About the problems of science and practice, tasks and ways to solve them» (Milan, 2020); Міжнародній науково-практичній конференції «Наукові дослідження для органічного бізнесу. Тваринництво заради ґрунту» в рамках IV Міжнародного Конгресу Органічна Україна» (Київ, 2020); Conference «Organization of scientific research in modern conditions 2020» (Washington, 2020); Міжнародній науково-технічній конференції «Якість

води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти» (Тернопіль, 2021); Щорічній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (Київ, 2021); II конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині», присвяченій 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові (Львів, 2021); Державній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми внутрішньої патології тварин», присвяченій пам'яті доктора ветеринарних наук, професора, академіка НААН, заслуженого працівника ветеринарної медицини України Левченка Володимира Івановича (Біла Церква, 2021).

Публікація матеріалів дослідження. За темою дисертаційної роботи опубліковано 37 наукових праць, з них 16 у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України, 7 статей у періодичних виданнях, включених до категорії «А» Переліку наукових фахових видань України, або у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus, 2 деклараційних патенти України на корисну модель, 9 тез конференцій, 2 методичні рекомендації, 1 Технічні умови України.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 366 сторінках комп'ютерного набору тексту. Вона складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, власних досліджень, аналізу та узагальнення власних досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку літератури, додатків. Робота ілюстрована 56 таблицями та 27 рисунками. Список використаної літератури налічує 591 джерело, з яких 27 кирилицею та 564 латинським шрифтом. До додатків увійшли акти впровадження результатів завершених наукових досліджень.

РОЗДІЛ I

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ризики при використанні хіміотерапевтичних препаратів для лікування корів за маститу

В останні десятиріччя світовий ринок екологічно чистих продуктів харчування бурхливо розвивається і стає альтернативою споживання продуктів, вироблених за традиційною технологією [108, 416]. Частка господарств, що постачають натуральну сільськогосподарську продукцію стає дедалі більшою [132, 313]. Ринок цих товарів швидко розширюється не тільки в розвинутих, а й у країнах що розвиваються, в тому числі в Україні [4, 8, 17, 347]. Цілі та принципи органічного виробництва по всій Європі чітко визначені, а маркетинг сертифікованих органічних продуктів ретельно регулюється Європейським Союзом з 1990-х років [164]. Хоча основні правила органічного виробництва визначені юридично, органічне тваринництво охоплює широке розмаїття виробничих систем, що варіюються як між країнами, так і всередині окремих держав [163, 245].

Органічна продукція – це продукція, отримана в результаті сертифікованого органічного виробництва [164, 529]. Характерною особливістю органічного сільськогосподарського виробництва є наявність суворо регламентованих умов та правил щодо належного утримання тварин, їх годівлі, лікування, профілактики захворювань та інших принципів, закладених в регламентах. Однією з вимог ведення органічного молочного господарства є заборона застосування хімічно-синтезованих традиційних ветеринарних лікарських препаратів або антибіотиків із профілактичною метою. Використання антибіотиків дозволяється лише за призначенням ветеринарного лікаря, при цьому період вибракування продукції від тварин, що лікуються, має бути удвічі більшим порівняно з традиційним періодом обмеження використання продукції [19, 294].

Нині мастит корів є найпоширенішим захворюванням на молочних фермах у всьому світі, як при органічному так і при звичайному веденні тваринництва [197, 273, 308, 378, 537]. Рівень захворюваності та етіологічний профіль маститу може значно відрізнятись між дійними стадами різних країн і навіть між стадами в межах однієї країни [408, 447]. За даними Міжнародної федерації охорони здоров'я тварин, поширеність маститу становить від 47 до 71 % на корову за рік. Наприклад, за даними [451] середня поширеність субклінічного маститу на органічних молочних фермах у Німеччині, Іспанії, Франції та Швеції становила 51,3 %. Дослідження показують, що поширеність субклінічного маститу в Африці та Азії також, зазвичай, перевищує 50 %, що загрожує благополуччю тварин, фермерам, переробникам молока та споживачам [381].

В Україні даних щодо поширеності маститу у корів на органічних фермах немає. Окремі дослідження вказують на те, що мастит діагностується у 28–48 % корів [13, 24, 25].

Запалення молочної залози має значний економічний вплив на молочну промисловість через зниження надоїв та погіршення якості молока, витрат на лікування, негативного впливу на добробут та раннє вибракування лактуючих корів, підвищення ризику стійкості збудників до протимікробних препаратів [273, 290]. Крім того, існує високий ризик зниження безпечності молочних продуктів та передачу патогенів через харчовий ланцюг [104, 292, 339]. Незважаючи на цілий ряд заходів контролю, ця хвороба залишається основною причиною економічних втрат у молочній промисловості в усьому світі. Загальні епідеміологічні дослідження щодо маститу корів повідомляють про те, що у більшості регіонів він залишається найбільш економічно значущим бактеріальним захворюванням молочної худоби і вимагає постійного контролю. В середньому економічні втрати, спричинені маститом складають 124 євро (147 доларів) на корову на рік, що призводить до збитків у 3 і 125 мільярдів євро в ЄС та у всьому світі відповідно [151]. Наприклад, у США вченими [532] за допомогою динамічного програмування оцінено втрати

від маститу у 179 доларів США (162 євро), схожі результати отримані [531] сума втрат оцінена в 155 доларів США (140 євро). У Нідерландах через мастит у корів втрачається близько 131 долар США на рік на одну корову [274]. Ці цифри переважно залежать від фактичної ціни на молоко та затрат на лікування, а також від тяжкості та тривалості захворювання.

Мастит характеризується патологічними змінами залозистої тканини вимені, фізико-хімічними та бактеріологічними змінами в молоці, які впливають на його безпечність та якість [16, 186, 364, 369].

Особливе значення у виникненні захворювання має мікробний фактор [390, 444, 565]. Відомо, що запальний процес завжди супроводжується інфекцією, причому більша частина запалень вимені корів викликається бактеріями, які потрапляють ззовні. В основному вони проникають через дійковий канал вимені, який вважається першою лінією захисту вимені від патогенів. Він відкривається і закривається сфінктером, крім того, дійковий канал вистелений багат шаровим плоским епітелієм, в клітинах цитоплазми якого утворюється кератин. Кератин складається з жирних кислот та волокнистих білків. Після потраплення мікроорганізмів в дійковий канал, волокнисті білки електростатично зв'язуються з патогенами, порушуючи їх шляхом зміни осмотичного тиску. В свою чергу, втрата здатності регулювати осмотичний тиск спричинює лізне клітинних мембран та загибель бактерій. Бактеріальні патогени, яким вдалося проникнути через дійковий канал і не піддатися активності кератину можуть викликати запальні процеси в молочній залозі [47, 459, 576].

Наступним етапом захисту організму від впливу патогенів є його імунна система. Вважається, що важкість перебігу хвороби залежить від імунної відповіді господаря [459]. З іншого боку автори заявляють, що основну роль в патогенезі маститу відіграють вид та вірулентність штаму мікроорганізму, який потрапляє в молочну залозу [69, 499].

На ранніх стадіях проникнення збудників у молочну залозу реакція імунної системи залежить від рецепторів клітинної поверхні, які здатні

розпізнавати мікробні білки. Поряд з цим починають вироблятися білки гострої фази запалення та цитокіни [190, 456]. Встановлено, що реакція організму є специфічною для різних типів антигенів [77, 246]. Так, інфекція спричинена кишковою паличкою, спричинила утворення набагато вищої кількості IgG та лактатдегідрогенази, ніж за інфекції, спричиненої грампозитивними бактеріями [380]. Вчені рекомендують додатково використовувати зміни концентрації лактатдегідрогенази у крові у поєднанні з кількісним вмістом соматичних клітин як маркер для диференціації інфекцій, викликаних грампозитивними і негативними бактеріями [533].

Мікроорганізми можуть бути як безпосередньою причиною виникнення маститу, так і ускладнювати запальні процеси у вимені, що виникають в результаті впливу на молочну залозу несприятливих факторів зовнішнього середовища. Широкий спектр мікроорганізмів, які можуть викликати мастит, і значне поширення цих бактерій у середовищі утримання тварин роблять малоімовірним повне викорінення маститів.

При органічному веденні тваринництва основна увага зосереджена на профілактиці захворювань, в тому числі і маститу корів. Вважається, що тварина, якій дозволено проявляти природню поведінку, не піддаватися стресу та споживати природні (органічні) корми матиме вищу здатність протистояти інфекціям, ніж тварина, яка вирощена на традиційних фермах. Таким чином, буде потрібно менше медикаментозного лікування. Попри це, не завжди вдається запобігти розвитку інфекцій. На органічних фермах для лікування маститу корів застосовують в основному гомео- та фітотерапію [167, 438]. Також за призначенням лікаря можуть застосовувати глюкокортикоїди такі як преднізолон. Він допомагає організму підвищити цілісність гематоенцифалічного бар'єру, чинить протизапальну, десенсибілізуючу та антигістамінну дію. Преднізолон може зв'язуватися з глюкокортикоїдними рецепторами та блокувати вироблення протизапальних цитокінів. Однак, преднізолон також порушує імунну систему молочної залози, знижуючи

концентрацію IgG в молоці, тим самим знижує природний захист молочної залози [174].

Практичний досвід показує, що фермери навіть при органічному веденні тваринництва не виключають використання антибіотиків, сульфаніламідів, нітрофуранів тощо [176, 399]. Дослідження показали, що кількість антимікробних засобів, що використовуються для лікування клінічного та субклінічного маститу, становить майже вдвічі більше, ніж кількість антибіотиків, що використовуються для лікування всіх інших захворювань у дійних корів.

Загальні переваги антибіотикотерапії включають в себе: швидке усунення бактеріальних патогенів, зниження ймовірності хронічних рецидивів інфекції, антимікробну дію в малих дозах, широкий спектр протимікробної дії [35, 512]. Більшість антибіотиків, які використовуються у молочному тваринництві є важливими для лікування інфекцій у людей, включаючи аміноглікозиди, цефалоспорины, фторхінолони, лінкозаміди, макроліди, пеніциліни, сульфаніламіди та тетрацикліни [239]. Деякі з цих антибіотиків Всесвітня організація охорони здоров'я класифікує як критично важливі. Наприклад, хінолони (енрофлоксацин і данофлоксацин) і бета-лактами розширеного спектру дії (цефалоспорины третього покоління), які активно використовуються для лікування маститу, вважаються «найбільш пріоритетними критично важливими» класами антибіотиків [567]. Дослідження, проведені за програмою Міністерства сільського господарства США та Національної системи моніторингу здоров'я тварин (NAHMS) повідомили, що клінічний мастит у корів зустрічається у 24,8 %, при цьому у 87,3 % випадків захворювання для лікування використовували антибіотики [567]. Майже три чверті господарств (73 %) використовували цефалоспорины, 34,4 % – цефалоспорины першого покоління, та 38,6 % – цефалоспорины третього покоління. Той самий звіт показав, що в США є сім інтрамамарних протимікробних препаратів, схвалених національною

програмою моніторингу здоров'я тварин: один препарат класифікується як лінкозамід (пірліміцин), а шість інших відносяться до бета-лактамів [473].

Незважаючи на великий успіх при лікуванні антибіотиками, виникає ряд негативних побічних впливів на організм тварин: вони пригнічують захисні сили організму, викликають морфологічні зміни в тканинах молочної залози, нерідко викликають подразнення епітелію молочних проток і альвеол, призводять до знищення сапрофітної мікрофлори. Їх тривале застосування викликає локальну іммунодепресію молочної залози та появу стійких до них рас мікроорганізмів [52, 59].

Поява антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів привела до неефективності лікування бактеріальних хвороб у тварин, збільшення захворюваності та смертності і, як наслідок, до тривалого бактеріоносійства [70, 74, 82, 365, 449]. Використання антибіотиків на молочних фермах може спричинити селекційний тиск, що призводить до появи та поширення патогенних, умовно-патогенних та патогенних антибіотикостійких бактерій від молочних ферм до людей. Обмін мікроорганізмами може відбуватися при прямому контакті великої рогатої худоби з людьми або опосередковано через харчовий ланцюг (молоко та м'ясо): горизонтальна передача генів резистентності може відбуватися від бактерій на молочних фермах до коменсальних або патогенних бактерій у кишечнику людини [463]. У багатьох небезпечних збудників маститів (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*) відзначається прогресування щодо розвитку резистентності. Все частіше дослідники виявляють множинно-резистентні (multiple drug resistance, MDR), абсолютно-резистентні (extensively drug resistant, XDR) та пан-резистентні ізоляти бактерій (pandrug-resistant (PDR) [75, 344]. Доведено, що бактерії активно обмінюються генетичними детермінантами резистентності [483]. Існує сформована концепція про набори факторів резистентності, властивих конкретним асоціаціям бактерій (резистом) [584], в тому числі бактерій організму людини (мікробіом) [497].

Основні генетичні механізми, що визначають лікарську стійкість у бактерій, які відносяться до різних таксономічних груп, значно відрізняються. Так, у метицилін-стійких *Staphylococcus aureus* (MRSA) важливу роль відіграє стафілококова хромосомна касета SCCmec [375, 405], у *Pseudomonas aeruginosa* - гени декількох типів ефлюкських насосів [111, 289], у ентеробактерій - гени бета-лактамаз розширеного спектру (БЛРС) [236, 562]. Свій внесок в резистенцію окремих видів бактерій вносять також і універсальні механізми стійкості до деяких класів препаратів: так, стійкість до хінолонів формується завдяки наявності точкових мутацій в генах, що кодують ферменти ДНК-гіразу і топоізомеразу IV. Велику роль у формуванні і поширенні найбільш «успішних» механізмів резистентності грають мобільні генетичні елементи (транспозони, інтегрони, IS-елементи, плазмідні) і універсальні процеси обміну генетичною інформацією (кон'югація, трансформація, трансдукція, рекомбінація) [584]. Таким чином, явище стійкості патогенних бактерій до антибактеріальних препаратів - природний еволюційний феномен, який неможливо зупинити.

Отже, проблема застосування антибіотиків та формування мікроорганізмами резистентності до них є однією з найсерйозніших загроз глобальної охорони здоров'я, адже стійкість до антибіотиків зростає з кожним роком.

Протимікробна терапія маститу корів в даний час базується на аналізі протимікробної сприйнятливості відповідно до стандартів CLSI. Традиційно мікробіологи оцінюють ефективність антибіотика шляхом вимірювання мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) і мінімальної бактерицидної концентрації (MBC) [357]. Практично у всіх діагностичних лабораторіях ці вимірювання проводяться на вільно плаваючих, планктонних, лабораторних фенотипах. Ці аналізи вимірюють тільки концентрацію хіміотерапевтичного агента, необхідного для пригнічення росту або знищення планктонних бактерій. Для деяких антибіотиків концентрація, необхідна для знищення біоплівкових форм мікроорганізмів, може перевищувати в тисячу разів

необхідну для знищення планктонних бактерій точно такого ж штаму [71, 514]. Тому використання типових лабораторних досліджень для вибору терапії при стафілококовому маститі може бути недостатнім. Після неефективного лікування мастит може переходити в хронічну форму, а корови можуть ставати безсимптомними носіями антибіотикорезистентних штамів бактерій [194, 450]. Проведення неефективного лікування захворювання також сприяє надходженню мікроорганізмів у продукти харчування та передачі генів антибіотикорезистентності від збудників до нормо мікрофлори людей [66, 67].

Поширеність інфекцій, спричинених золотистим стафілококом, коливається від 2 % до понад 50 % серед інших патогенів, при цьому мастит у корів займає 10–12 % усіх стафілококових захворювань [175]. Так, дослідниками встановлено, що в етіології маститів корів в Україні превалюють *Staphylococcus spp.*, які виділяються у 45,0 % випадків, в той час *Streptococcus spp.* ідентифікують у 29,3 %, а *Escherichia coli* - у 17,8 %. При цьому стафілококи проявляють стійкість до бензилпеніциліну у 55,8 %, оксациліну - 30,3 %, тетрацикліну - 89,6 %, азитроміцину - 63,9 % та еритроміцину у 55,8 %. [1, 367].

Іншими дослідженнями показано, що поширеність *S. aureus*, *E. coli* та *P. aeruginosa* становила 30 %, 17 % та 3,5 % відповідно. При цьому 90 % штамів *S. aureus* виявили стійкість до пеніциліну, тоді як лише 10 % штамів були стійкими до оксациліну [447]. Також згідно досліджень [573] прослідковується значна стійкість золотистого стафілококу до більшості антибіотиків. Так, культури *S. aureus*, виділені від великої рогатої худоби, хворої на мастит, були стійкі до цефокситину (75 %), цефтазидиму (75 %), амоксициліну (71,4 %), цефотаксиму (67,8 %), цефепіму (66,1 %), оксациліну (64,3 %), норфлоксацину (60,7 %) і гентаміцину (58,9 %). За даними [68] антимікробна стійкість ізолятів *S. aureus* коливалася від 1,3 % для цефтіофуру до 25 % для сульфадиметоксину. З 239 культур *S. aureus*, 82 (34,3 %) були стійкими принаймні до 1 з 10 антимікробних препаратів. Загалом, поширеність

антибіотикостійких патогенів у господарствах з часом змінювалась із тенденцією до зростання резистентності до тетрацикліну.

Особливе занепокоєння викликає поява та поширення *LA-MRSA*. Враховуючи відсутність клінічних ознак при субклінічному маститі та несвочасне розпізнавання інфекції, ізоляти часто можуть потрапляти в харчовий ланцюг людини через молоко. Так, частота виділення *MRSA* від корів, хворих на мастит, у Фінляндії складала 1,6 % [409], Ірані – 11,57 % [328], Бельгії – 10 % [256], Японії – 39,74 % [271], Індії – 13,1 % [332], Бангладеші – 29 % [387]. Нещодавно бактеріологічними дослідженнями, проведеними в Україні, встановлено, що 3 ізоляти із 12 були віднесено до *MRSA* (25 %), у яких підтверджено наявність *mecA*-гену [7].

Отже, з оглянутих літературних джерел підрозділу 1.1 видно, що мастит у корів – це широко поширене захворювання, яке реєструється на молочних фермах усіх континентів нашої планети і завдає значної шкоди як тваринам, що виробляють органічне молоко, так і коровам за традиційної технології виробництва молока. При цьому основна причина поширення маститу це те, що дане захворювання спричиняється збудниками, які постійно циркулюють у середовищі молочних ферм, та в більшості випадків вони належать до умовно-патогенної або сапрофітної мікрофлори. Дані мікроорганізми за умови лікування маститу антимікробними засобами без належної лабораторної діагностики і визначення ефективної дії біоцидів набувають різного виду резистентності, яка ускладнює перебіг хвороби і застосовувані лікувальні процедури. Також дослідження вчених показують, що серед основних збудників маститу корів *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* тощо, на частку патогенів із роду *Staphylococcus* припадає від 2 до 50 %, що залежить від стада тварин. Це спонукає до пошуку нових превентивних заходів і схем лікування, профілактики маститу, спричиненого *S. aureus* як патогена, здатного забруднювати молоко сировину і молочні продукти та спричиняти токсикоз у споживачів.

1.2. Особливості фармакотерапії при стафілококовому маститі у корів

Багато грамозитивних та грамнегативних патогенів можуть викликати мастит [265]. Найчастіше збудником, який викликає інтрамамарні інфекції, що часто залишаються невиявленими та погано реагують на лікування антибіотиками, є золотистий стафілокок [370, 477]. Незважаючи на очевидну позитивну протимікробну вразливість *in vitro*, лікування тварин, хворих на мастит, часто призводить до повторних випадків клінічних та хронічних проявів захворювання [257, 388].

Існує думка, що чинники, які запускають вроджену та індуковану імунну систему корови можуть сприяти персистенції золотистого стафілококу в молочній залозі. Однак, здатність проникати в епітеліальні клітини, утворювати біоплівку та полісахаридні капсули найчастіше пов'язують з персистенцією самого *S. aureus* [81]. Золотистий стафілокок може проникати в тканину, прикріплюючись безпосередньо до епітелію молочної залози за допомогою адгезивних білків, які розміщені на поверхні бактеріальної стінки та здатні розпізнавати макромолекули тканини господаря [352]. Окрім білків, інші структурні елементи клітинної стінки, такі як полімери тейхоєвої кислоти, також можуть брати участь в процесі адгезії, яка є передумовою колонізації та інвазії клітин макроорганізму [324, 505, 506]. Більше того, результати деяких досліджень стверджують, що бактерії стафілококу можуть проникати і зберігатися протягом тривалого часу в багатьох нетипових фагоцитарних клітинах [191, 591] і навіть у макрофагах, отриманих з моноцитів людини [302].

Для золотистого стафілококу характерними є різні фактори вірулентності, він може продукувати токсини та утворювати біоплівки, які є основним чинником в патогенезі маститу [419].

Здатність золотистого стафілококу формувати біоплівки сприяє прикріпленню його до епітелію молочної залози, проліферації та колонізації [183, 434]. Саме продуценти біоплівки *S. aureus* здатні спричинювати стійкі

інфекції молочної залози корови, які важко піддаються лікуванню [587]. Більше того, деякі штами *S. aureus* можуть продукувати капсульний полісахарид, що робить їх значно стійкішими до макрофагів [136].

Поряд з цим збереження золотистого стафілокока сприяє його фенотипова та геномна пластичність. Про це свідчить наявність, так званих, «малих» колоній у корів з хронічною інтрамамаральною інфекцією [145, 496]. Такі субпопуляції мають атипів морфологічні та біохімічні властивості та здатні виживати у внутрішньоклітинному середовищі, яке захищає їх від впливу імунної системи тварини та дії антибактеріальних речовин [145, 235].

Хоча антибіотики є першим інструментом при боротьбі з бактеріальними інфекціями, поява патогенів з множинною антибіотикорезистентністю серед стафілококів становить серйозну проблему через неефективність антибактеріальної терапії. Така ситуація потребує освоєння альтернативних методів лікування, оскільки антибіотики більше не розглядаються як ефективний інструмент боротьби з маститом великої рогатої худоби, спричиненим золотистим стафілококом [503].

Нині існує багато досліджень, направлених на вивчення механізмів персистенції золотистого стафілококу в молочній залозі [252]. Золотистий стафілокок потрапляє в отвір дійки вимені і запускає вроджену імунну систему корови. При цьому він, очевидно, не запускає передачу сигналів класичних рецепторів розпізнавання антигенів, таких як *toll*-подібні рецептори (TLRs) та не активізує білковий комплекс *NF-κB* в молочній залозі [392]. Це явище пояснює відносно низький рівень імунної відповіді при інтрамамаральних інфекціях стафілококової етіології [222].

Попри це, деякі дослідники заявляють, що *S. aureus*, виділений при маститі великої рогатої худоби може стимулювати експресію невеликої кількості *toll*-подібних рецепторів, які активують *NF-κB* [291]. Попри це, експресія капсульного полісахариду може перешкоджати розпізнаванню цих рецепторів [272, 539].

NF-κB відповідає за транскрипцію протизапальних цитокінів (особливо *IL-6* і *TNF-α*), які відповідають за мігрування нейтрофілів з крові в інфіковану молочну залозу [579]. Коли адаптивна імунна система виходить з ладу, збільшується вироблення опсонізуючих антитіл, які підвищують ефективність фагоцитозу нейтрофілів [50]. При цьому *IgG2* є основним опсонічним антитілом, присутнім у крові та молоці [209].

Проте дослідниками було доведено, що стафілокінази здатні активувати плазмін на поверхні бактеріальної стінки, який каталізує деградацію імуноглобулінів [470], а синтез полісахаридних капсул може зупинити розпізнавання макрофагів, спрямованих проти бактерії і запобігти активації комплементу.

Внутрішньовименна імунна відповідь на дію золотистого стафілококу все ще залишає багато невивчених питань, оскільки для дослідження реакції епітелію молочної залози здебільшого використовують один штам патогену, а для розуміння всіх механізмів імунної відповіді необхідні додаткові дослідження з використанням різних штамів. Однак, реакція імунної системи корови на проникнення *S. aureus* насамперед залежить від його патогенних властивостей [153].

Золотистий стафілокок раніше не розглядався як внутрішньоклітинний патоген. Проте, в даний час добре відомо, що він може виживати в різних клітинах ссавців, викликаючи хронічну інфекцію [209, 590]. Такий механізм виживання може захищати *S. aureus* від імунного впливу господаря [106, 252]. Епітеліальні клітини паренхіми молочної залози лактуючих корів є домінуючим типом клітин, які піддаються впливу патогенів на ранніх стадіях ураження [191]. Проте дослідження виявили [536], що при потраплянні *S. aureus* у молочну залозу та колонізуючи клітини, більша частина бактерій знаходилася в макрофагах порівняно з альвеолярними клітинами, що ще більше посилює захист патогену від імунної системи макроорганізму.

Проникнення золотистого стафілококу в внутрішньоклітинне середовище відбувається у два етапи: ліганд-рецепторна взаємодія та активність

тирозинкінази [250, 495]. Поглинання бактерії починається з прикріплення через специфічні взаємодії між компонентами мікробної поверхні, розпізнавальними молекулами адгезивної матриці, які включають фієктин-зв'язуючі білки, фібриноген-зв'язуючі білки та клітину-господаря [44, 548, 581]. Потім інтегруми можуть викликати передачу сигналів, що призводить до перебудови цитоскелету та активної інтерналізації бактерії в ендосомах [181, 323]. Деякі штами стафілококів можуть проникати з фагосоми до цитоплазми та пригнічувати активність цитотоксинів та зберігатися у клітині протягом тривалого періоду [505, 506].

У більшості видів патогенів здатність утворювати біоплівку пов'язана з інвазивністю [121, 312]. Тим не менш, цей зв'язок для *S. aureus* до кінця не вивчений і деякі автори припускають, що інтенсивність інвазії *S. aureus* не пов'язана з утворенням біоплівок [185, 412, 591]. Іншими вченими доведено, що присутність полісахаридних капсул може замаскувати поверхневі адгезини, що дозволяє запобігати адгезії, яка вважається першим кроком при внутрішньоклітинній інвазії. Тоді як первинна адгезія зумовлена фібронектин-зв'язуючим білком (А і В), який сприяє надекспресії білків *fibA* і *fibB*, які, в свою чергу, збільшують здатність проникати стафілококу в епітеліальні клітини молочної залози [446].

1.3. Альтернативні антибіотикам профілактичні та фармакотерапевтичні методи боротьби з стафілококовим маститом у корів

Біоплівка це співтовариство мікроорганізмів, прикріплених до поверхні та один до одного, укладені в матрикс синтезованих ними позаклітинних полімерних речовин, які демонструють зміну фенотипу, що виражається в зміні параметрів росту і експресії специфічних генів [501, 511, 556].

Клітини бактерій у біоплівці мають складну поліморфну організацію з певною цитоархітектонікою. Багатошарова топографія впливає на метаболізм

і фізіологічну активність клітин. В межах біоплівки можуть відбуватися зміни, що включають реакцію загального стресу, зупинення ключових метаболічних процесів і індукцію захисних механізмів. Знижений метаболізм мікроорганізмів у біоплівці веде до появи антибіотикостійкості, так як антибактеріальні препарати найбільш ефективні відносно метаболічно активних клітин [336].

Крім того, знижена сприйнятливість мікроорганізмів у біоплівці до антибактеріальних речовин зумовлена довільною присутністю клітин із резистентним фенотипом (відомими як "персистери") та/або погане проникнення антибіотиків в полісахаридну матрицю [507, 508]. Оскільки для того, щоб поживні і протимікробні молекули попадали в мікробні клітини в біоплівках, вони повинні дифундувати через матрицю біоплівки або слиз, який продукується бактерією. Це дифузне обмеження може бути результатом обмеження транспорту (нездатності антимікробних молекул дифундувати через полімерну матрицю), або інактивації антимікробної молекули матеріалом матриці. Крім того, позаклітинна матриця, яка необхідна для з'єднання бактерій у біоплівки, може складатися з полісахаридів, білків і позаклітинної ДНК (eДНК). Вченими доведено, що eДНК функціонує як матричний компонент та відповідає за антибіотикостійкість мікроорганізмів в біоплівках, утворених *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. intermedius* та інші. Ці захисні механізми діють синергічно, забезпечуючи загальну підвищену стійкість біоплівки до антимікробних сполук [303, 508].

Формування біоплівки золотистим стафілококом всередині молочної залози може стимулюватися деякими чинниками, наприклад субінгібіторні концентрації антибіотиків, або компонентами молока, такими як лактоза чи протеази [51, 116].

Розвиток біоплівки *S. aureus* в середині молочної залози можна поділити на такі етапи: прикріплення бактерії до епітелію, проліферація та формування структури біоплівки та її відшарування [85, 117].

Адгезія до епітеліальних клітин – це перша стадія утворення біоплівки, яка забезпечується стафілококовими поверхневими білками, що зв'язуються з білками матриксу клітини епітелію [439]. Наступним кроком є дозрівання біоплівки. У цю фазу *S. aureus* продукує полімерні речовини, які утворюють матрицю, що забезпечує адгезію між бактеріальними клітинами. Ця матриця складається з ліпідів, полісахаридів, гумінових речовин, білків та позаклітинної ДНК. При цьому основним компонентом матриці є полісахарид міжклітинної адгезії, який синтезується за допомогою ферментів, що кодуються *ica* опероном. Нині це найбільш зрозумілий механізм утворення біоплівки у стафілококів *in vitro* чи *in vivo* [159, 538].

Попри це, відомий ще один механізм формування біоплівок у стафілококів, виділених за маститу корів. *S. aureus* здатний продукувати білок (*Vap*) [103], який викликає утворення біоплівки без екзополісахаридів [337]. Доведено, що присутність локуса *ica* та гену *Vap* може сприяти утворенню біоплівок та здатності ізолятів *S. aureus* до інтрамамарної інвазії [103].

Важливим процесом дозрівання біоплівки є формування каналів, які полегшують циркуляцію живильних речовин у більш глибокі шари біоплівки та евакуацію відходів.

Останнім кроком у формуванні біоплівки є її відшарування, яке включає використання протеаз, нуклеаз [125, 293] та пептидів з поверхнево активними речовинами, які руйнують нековалентні зв'язки між клітинами біоплівки та молекулами матриксу [389].

Характерною ознакою патогенезу *S. aureus* є хронічна персистенція [418]. Це пов'язано не лише з біоплівками, а й із так званими «малими колоніями» та персистентними клітинами, які існують у вигляді субпопуляцій стафілококів, що складаються з фенотипових та генотипових варіантів та проявляють високу толерантність до антибіотиків [172].

Перераховані фактори в певній мірі пояснюють недостатню ефективність лікування маститів у корів та виникнення рекурентних інтрамамаральних інфекцій. Отже, враховуючи особливості механізмів

персистенції золотистого стафілококу в молочній залозі корови необхідно розробити ефективні методи профілактики та лікування стафілококового маститу.

Отже, з літературних джерел підрозділу 1.2 випливає, що завдяки наявності значної кількості механізмів персистенції золотистого стафілококу у молочній залозі корови та наявності генів, які визначають стійкість до лікарських засобів, необхідно проводити дослідження щодо розроблення альтернативних антибіотикам методів лікування стафілококового маститу.

Формування резистентності до антимікробних препаратів є природним адаптаційним механізмом мікроорганізмів і представляє серйозну ветеринарну, медичну та соціально-економічну проблему [120, 553].

Очевидною альтернативою застосування антибактеріальних препаратів при терапії маститів корів є використання високоефективних екологічно безпечних лікарських засобів [309]. Найбільш відомі способи лікування інтрамамарних інфекцій, спричинених золотистим стафілококом, включають використання бактеріоцинів [29, 62], пробіотиків [217, 454, 524, 549], біоактивних фітохімічних речовин [217, 259, 525], бактеріофагів [41, 88, 96, 171], гомеопатичних препаратів [217], вакцин [80, 382] та відбору генетично стійкого до маститу стада тварин [124, 253].

1.3.1. Використання пробіотичних препаратів для лікування і профілактики маститу у корів

Серед можливих заходів боротьби з маститом велику увагу привертає використання пробіотиків. За даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН та Всесвітньої організації охорони здоров'я, пробіотики – це «живі мікроорганізми, які при введенні в достатніх кількостях корисні для здоров'я господаря» [542]. Це широке визначення, що включає різноманітні мікроби та їх застосування. Було запропоновано кілька критеріїв, які більш точно визначають пробіотики: мікроби повинні бути життєздатними, визначеними на рівні виду, безпечними для використання за призначенням, і

вони повинні продемонструвати користь для здоров'я при використанні в адекватних кількостях [487, 542].

Пробіотики, які можуть використовуватися для внутрішньомамального введення передбачають два основних механізми дії. Перший (непрямий) вплив полягає у безпосередній взаємодії між пробіотиками та місцевою мікрофлорою. Такий механізм передбачає, що мастит у корів виникає через дисбаланс між нормальною мікробіотою молочної залози та патогенними бактеріями. В свою чергу, відновлення цього балансу за допомогою пробіотиків профілактує розвиток маститу. Другий запропонований спосіб дії це безпосередній вплив протимікробних речовин, які виробляються молочнокислими бактеріями (молочна кислота, оксид азоту, перекис водню, бактеріоцини) на збудники маститу [460].

Основними умовами для використання штаму як пробіотика при інтрамамарних інфекціях є те, що він повинен адгезуватися до епітеліальних клітин, не містити цитотоксичних сполук і проявляти антагоністичну активність щодо патогенних бактерій [27, 300]. Пробіотики можуть по різному використовуватися при боротьбі з маститом. Їх можна застосовувати перорально, внутрішньовименно або для обробки дійок. Загалом дослідники повідомляють про позитивні результати при вивченні взаємодії *in vitro* пробіотичних штамів з патогенними, які виділені при маститі [460]. Проте, пероральне застосування молочнокислих бактерій для лікування маститу у жінок було піддано критиці і визнано безрезультатним [455]. Перспективи пероральних пробіотиків швидше пов'язані з неспецифічною оздоровчою дією на організм в цілому. Так, введення в схему лікування маститу у корів пробіотика Бактоцеллолактин підвищує терапевтичну ефективність на 16,6 % [549].

Внутрішньоцистернальне введення пробіотичних бактерій для профілактики або лікування маститу у жуйних також викликає багато сумнівів. Відомо, що молочнокислі бактерії, наприклад, деякі стрептококи або ентерококи можуть бути патогенними для молочної залози жуйних тварин та

викликати імунну відповідь у молочній залозі [129]. Так, наприклад, інфузія *L. lactis* в молочну залозу корови індукувала інтенсивне рекрутування нейтрофілів, підвищення концентрації білків гострої фази в молоці та надекспресію генів, що кодують хемокін *IL-8* та прозапальний цитокін *IL-1 β* [45, 129]. Але автори також повідомляють, що така дія може бути штамоспецифічною.

Запальна реакція, викликана внутрішньоцистернальною інфузією молочнокислих бактерій, перешкоджає широкомасштабному профілактичному застосуванню у лактуючих тварин, проте дослідники не виключають їх застосування у період сухостою [575].

Дійковий канал – це порт для проникнення більшості патогенів, які викликають мастит. Враховуючи, що шкіра дійки є потенційним резервуаром патогенів молочної залози, таких як *S. aureus*, колонізація цієї ділянки молочнокислими мікроорганізмами, як антагоністами даного патогену заслуговує уваги. Дослідження, проведене [33] показало, що обробка дійок дезінфікуючим засобом із вмістом молочнокислих мікроорганізмів може зменшити кількість бактерій, які спричиняють мастит та покращити мікробіоту шкіри вимені корів. Проте, такі дані дуже обмежені та потребують подальших досліджень.

Бактеріоцини це клас природних пептидів з антимікробними властивостями, які можуть використовуватися при боротьбі з маститом. Вони рибосомно синтезуються практично всіма існуючими видами бактерій та здатні порушувати цілісність мембрани на поверхні бактерії, що призводить до витоку вмісту клітини та розсіювання мембранного потенціалу. Одним з відомих бактеріоцинів є антибіотик низин. Дослідження показали, що низин має високу протимікробну здатність знищувати біоплівки *S. epidermidis* та *S. aureus*. Також показано, що стафолокоцин, який синтезується видами бактерій роду *Staphylococcus* має потужну антибіоплівкову активність проти *S. aureus* та *S. epidermidis* [109]. Його успішно використовували для запобігання утворення біоплівки на ортопедичних імплантатах при проведенні

експериментальних досліджень на тваринах. Важливим аспектом, пов'язаним із застосуванням бактеріоцинів як антимікробних засобів, є їх синергетичний ефект з антибіотиками або іншими класами бактерицидних препаратів. Було показано, що нещодавно відкритий бактеріоцин класу II, гарвіцин KS, є потужним інгібітором *S. aureus in vivo* у поєднанні з пеніциліном G та тіопептидним бактеріоцином мікрококцином P1 [407].

Отже, результати які існують сьогодні щодо використання пробіотиків для профілактики та лікування корів за маститу загалом суперечливі та вимагають подальших досліджень щодо їх застосування.

1.3.2. Використання препаратів на основі ефірних олій у лікуванні та профілактиці маститу у корів

В останні роки багато досліджень були направлені на вивчення антибіоплівкової активності ефірних олій та рослинних екстрактів [270, 286, 475]. Антимікробні властивості деяких рослин добре описані, а рослинні екстракти та ефірні олії часто вважаються безпечними для тварин, людей та навколишнього середовища. Продукти на основі трав'яних екстрактів та ефірних олій використовуються у формі спреїв, мазей або суспензій для внутрішньоцистернального введення, часто використовуються для лікування маститу у жуйних тварин, особливо на органічних фермах [569].

Механізм впливу ефірних олій на бактерії пов'язаний з їх хімічним складом, який досить різноманітний: кожна молекула діє на певну мішень. Так, ефірні олії можуть націлюватися на клітинну мембрану, порушуючи енергетичний статус клітини та метаболічну регуляцію. Іноді вони можуть змінювати експерсію оперонів, пригнічуючи їх медіатори. Ліпофільний характер молекули ефірних олій робить їх здатними проникати через подвійний фосфоліпідний шар клітинної мембрани, тим самим порушуючи транспортування живильних речовин [270, 479]. Однак деякі штами бактерій здатні протистояти такому впливу шляхом використання іонного насоса.

Ефірні олії також можуть впливати на біосинтез ліпідів. Вони в бактеріальній клітині, навіть у концентрації нижче мінімальної інгібуючої, знижують рівень ненасичених жирних кислот [465].

Дослідження *in vitro* продемонстрували антибактеріальну активність ефірних олій проти кількох патогенів, які можуть викликати мастит, таких як: *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. coli* та *S. aureus* [60, 398]. Хімічні складові ефірних олій пошкоджують клітинну стінку та мембрану бактерії шляхом деградації, денатурації та дестабілізації білка. Враховуючи їх ліпофільну природу, вони можуть проникати через біліпідний шар мембрани бактеріальної клітини, викликаючи втрату цілісності та структурної організації. Загалом, встановлено, що грампозитивні бактерії більш чутливі до руйнівної активності, ніж грамнегативні, ймовірно, через ліпополісахариди на зовнішній стороні клітинної стінки [42].

У літературі досить мало досліджень з використання ефірних олій *in vivo* для лікування маститу у корів. Вченими [296] досліджено дію 10 % суміші *Thymus vulgaris* і *Lavandula angustifolia* при маститі шляхом її внутрішньоцистернального введення та зовнішнього застосування. Встановлено, що після чотирьох днів лікування кількість бактеріальних клітин значно зменшилася, при цьому найбільша антибактеріальна активність була досягнута при масажі вимені цією сумішшю. Інше дослідження було проведено для оцінки ефекту *Origanum vulgare* шляхом внутрішньомамарної інфузії: 0,9 мл ефірної олії вводили двічі на день протягом трьох днів. В результаті *S. aureus* і *E. coli* не виявлені в молоці після лікування [552]. Також, внутрішньовименне введення олії шавлії тваринам, ураженим субклінічним маститом, призводило до значного зниження кількості соматичних клітин через 24 та 48 годин після застосування. З іншого боку, дослідниками [338], які використовували для лікування маститу ефірні олії *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus verbenone* та *Laurus nobilis* отримано незадовільні результати: терапевтична ефективність складала лише 40 %.

Антимікробна активність рослин пов'язана також з наявністю в їх складі флавоноїдів, терпеноїдів та дубильних речовин, які діють як антибактеріальні речовини.

Так, дослідниками встановлено, що флавоноїд хризин, виділений з *Passiflora caerulea* проявляв бактеріостатичну активність проти грамнегативних бактерій, таких як кишкова і синьогнійна палички [57]. Аналогічно, байкаліни мали інгібуючий вплив на *S. aureus* та на ріст спороутворюючих *Bacillus subtilis* [57]. Особливістю цих флавоноїдів є їх синергетична взаємодія у поєднанні з іншими антимікробними агентами. Так, мірицетин, дацистин, кемпферол, кверцетин та лютеолін пригнічували ріст MRSA та VRE [586].

Крім того, поєднання протимікробних фітохімічних речовин з комерційними препаратами розширює поле для застосування цих природних сполук і може мінімізувати вплив стійкості патогенів [343, 394]. В дослідженні [48] виявили, що етилгалат очищений, виділений із висушеної стручки тара (*Caesalpinia spinosa*), посилює чутливість до β -лактамів у метицилін-резистентних та метицилін-чутливих штамів *S. aureus* (штами MRSA та MSSA відповідно). Також доведено, що лектин, виділений з листя *Calliandra surinamensis pinnulae* володіє антибіоплівковим ефектом проти золотистого стафілококу, що спричинює мастит, та проявляє синергетичний потенціал при його застосуванні в комбінації з ампіциліном чи тетрацикліном [350].

Обнадійливі результати були отримані при дослідженні терапевтичної дії засобів для місцевого застосування за лікування, ускладненого тріщинами, гіперкератозу сосків вимені. Препарат на основі ефірних олій та хлорофіліпту («Мазь для ран») показав 100 % ефективність, середній термін загоєння тріщин сосків складав $7,4 \pm 0,4$ доби. Крім того, лікування корів із важким ураженням сосків гіперкератозом дало можливість підвищити якість молока за показником соматичних клітин на 44,3 % порівняно з показниками корів контрольної групи [21].

Також відомо, що значний ефект отримують за використання ефірних олій, отриманих шляхом новітніх технологій, які підсилюють позитивний ефект. Результати досліджень виявили, що після застосування внутрішньоцистернального бальзаму Tim-O-Mast® кількість МАФАНМ у молоці корів через три години знизилася на $6,5 \cdot 10^3$ КУО/мл, а через 24 год на 34,4 %. При цьому ріст культур молочнокислих мікроорганізмів, таких як *L. plantarum*, *S. thermophilus* і *L. acidophilus*, у середовищі з молоком корів після застосування Tim-O-Mast® не відрізнявся за кількістю порівняно з молоком корів контрольної групи [286].

Проте, незважаючи на їх великий потенціал як неантибіотичних антибактеріальних агентів, ефірні олії мають ряд недоліків, включаючи нестабільність, інтенсивний запах, біологічну розкладність і низьку розчинність у певних розчинах. Ці проблеми обмежили застосування ефірних олій у харчовій та медичній промисловості.

1.3.3. Використання вакцин, імуностимуляторів та антимікробних пептидів для профілактики маститу у корів

Одним з ефективних методів боротьби з маститами корів, спричиненими золотистим стафілококом, є використання вакцин [80, 382]. Вакцинація проти бактерій, що спричинюють мастит, викликає імунну відповідь корови, яка в подальшому бореться з інфекцією. Ефективна вакцинація підвищує адаптивний гуморальний (опосередкований антитілами *Th2*) і клітинний (опосередкований клітинами *Th1* і *Th17*) імунітет проти збудника маститу, який пригнічує або обмежує ріст патогенів чи вбиває бактерії під час їх потрапляння в молочну залозу. Високий імунітет запобігає розвитку інфекції шляхом зменшення кількості бактерій, що безпосередньо проникають в молочну залозу та зменшує пошкодження тканин, що сприяє швидшому та ефективнішому виліковуванню [314].

За даними дослідників [214] багато вакцин розроблено для попередження розвитку інтрамамарних інфекцій. Однак, отримані результати

при тестуванні вакцин у польових умовах різні, а кількість рецензованих досліджень обмежена. Більше того, досить мало вакцин проти *S. aureus* було комерціалізовано та доступно в ЄС. На європейському ринку широко представлена комбінована вакцина проти *S. aureus*, коагулазонегативних стафілококів та *E. coli* фірми *Startvac*® (Hirpa, Girona, Іспанія). Стафілококовий компонент *Startvac* складають бактерини *S. aureus* з високою концентрацією екзополісахаридів, які можуть включати фенотипи біоплівкоутворення [572, 510]. За результатами досліджень [215] вакцинація *Startvac*® зменшила частоту виділення золотистого стафілококу на 45 %, а коагулазонегативних на 35 %. Водночас автори наголошують, що вакцинація є лише додатковим засобом боротьби зі стафілококовими інфекціями на молочних фермах.

Також на ринку США відома вакцина проти золотистого стафілококу компанії *Lysigin*® (Boehringer Ingelheim, Duluth, GA, США). Результати досліджень отримані [570] та показали, що вакцинація молочних телиць бактерином *S. aureus* від компанії *Lysigin*® зменшує виникнення стафілококового маститу на 60,9 %, та зменшення кількість соматичних клітин на 50 % порівняно з тваринами, яким не проводили вакцинацію. В іншому дослідженні, при щепленні корів *Lysigin*® кількість рівень антитіл не відрізнялися від невакцинованих тварин, що свідчить про те, що вакцинація забезпечувала мінімальний імунний захист [148].

В Україні розроблена мультикомпонентна вакцина проти пневмоентеритів, ендометритів, маститів, анаеробної ентеротоксемії, некротичного гепатиту, злякисного набряку, колібактеріозу, сальмонельозу Мультибовісан®. Вченими доведено, що застосування даної вакцини зменшує загибель тварин у 3-5 разів та сприяє підвищенню відтворювальної здатності самок, стійкості до захворювань, життєздатності та збереженню новонародженого молодняку та швидкому одужанню важкохворого молодняку [5, 22].

Вченими доведено ефективність застосування вакцини Мастивак[®] для профілактики маститу у корів [342]. Введення препарату Мастивак[®] сприяє нормалізації клітинних показників резистентності у хворих тварин, збільшенню загальної кількості лейкоцитів при субклінічній та клінічній формі захворювання, а також збільшенню абсолютної кількості созинофілів, паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів [342].

Дослідження щодо ефективності застосування вакцин проти золотистого стафілококу при маститі корів дещо суперечливі, проте більшість авторів повідомляють, що комерційно доступні вакцини проти *S. aureus* мають обмежену здатність запобігати новим інфекціям, істотно не впливають на кількість соматичних клітин у молоці, хоча при застосуванні вакцин може підвищуватися швидкість спонтанного виліковування внутрішньомамарних інфекцій та зменшуватися розвиток клінічних симптомів [216]. Однак, підвищення імунної відповіді не завжди може бути корисним при лікуванні корів за маститу через зниження безпечності та якості молока наявність великої концентрації імунних клітин у молочній залозі не гарантує зменшення кількості інфекційних патогенів, навіть якщо вони не спричинюють захворювання [224]. Ще однією перешкодою для ефективної вакцинації корів проти маститу є обсяги молока, присутні в залозі, яке розбавляє кількість імунних ефektorних клітин, доступних для боротьби з інфекцією. Крім того, жир і казеїн в молоці знижують бактерицидні властивості імунних клітин [571]. Донині жодна вакцина не змогла забезпечити повний захист від стафілококового маститу [308, 522]. Тому необхідні подальші дослідження щодо розробки вакцин, які зможуть ефективно профілакувати інтрамамарні інфекції у тварин.

Імуностимулятори – це сполуки, які активують компоненти вродженої імунної системи хазяїна та сприяють підвищенню стійкості до хвороб [397, 205]. Імуностимулятори безпосередньо впливають на вроджені імунні реакції шляхом активації імунних клітин (фагоцитів), системи комплементу та підвищення активності лізоциму [156]. До імуностимуляторів відносять

широкий спектр речовин, включаючи мінерали (селен і цинк), амінокислоти (лейцин, аргінін і убенімекс), вітаміни (А, Е, С), рослини та рослинні полісахариди, бактеріальні компоненти (β -глюкан, пептидоглікан, ліпополісахарид), гормони та гормоноподібні речовини, препарати нуклеїнових кислот, хімічні замінники (іміквімод, циметидин, левамізол, поліінозінова кислота, підотімод тощо), цитокіни (трансферний фактор, інтерферон, імуноглобулін та інтерлейкін) тощо [26, 502].

Дослідники повідомляють, що додавання імуностимуляторів до корму тварин підсилює їх вроджений імунітет та запобігає розвитку інфекцій [2, 263]. Встановлено, що цитозин-фосфат-гуанін (імуностимулятор олігодезоксинуклеотидів) стимулює проліферацію В-клітин, вироблення цитокінів та посилює вироблення цитокінів і цитотоксичну активність *NK*-клітин [530]. Повідомляється, що застосування протимаститного препарату, що містить левамізол, формалін та янтарну кислоту дозволяє отримати високу терапевтичну ефективність при клінічних формах маститу: при гнійно-катаральному – 78,6 %, при серозно-катаральному – 88,9 % і запобігти поширенню запального процесу. При цьому спостерігається позитивна динаміка зміни кількості еритроцитів, оптимізація рівня гемоглобіну, активація захисних механізмів організму [23].

Антимікробні пептиди також є потужними природніми антибактеріальними агентами, які володіють широким спектром дії проти грампозитивних та грамнегативних бактерій [63, 234]. Вони можуть безпосередньо вбивати бактерії, руйнуючи клітинні мембрани та створюючи трансмембранні канали та діяти опосередковано як імуномодулятори [198]. Антимікробний вплив пептидів пояснюється їх позитивним зарядом, який взаємодіє з негативно зарядженими мембранами у бактерій (ліпополісахариди у грамнегативних та тейхові кислоти у грампозитивних бактерій), що допомагає їм зв'язуватися і проникати всередину клітини, спричинюючи витік її вмісту та загибель [30, 198]. Вченими доведено ефективність специфічних антимікробних пептидів проти золотистого стафілококу, виділеного з

молочної залози. У дослідженні [305] вивчали внутрішньоклітинну активність H_2 в епітеліальних клітинах молочних залоз великої рогатої худоби та молочних залозах мишей, інфікованих *MRSA*, та мультирезистентним *S. aureus*. Результати показали, що за дії H_2 відбулося інгібування 99 % бактерій всіх *S. aureus*, отже антимікробні пептиди можуть використовуватися як безпечний та ефективний антимікробний агент для лікування інфекцій, спричинених золотистим стафілококом. Однак, таких результатів нині недостатньо та необхідно проводити додаткові дослідження для отримання інформації про розвиток резистентності до пептидів та їх широкого використання у ветеринарній медицині.

1.3.4. Антибактеріальні препарати при фармакотерапії маститу з наночастками, прополісом, йодом, хітозаном тощо

Останніми роками проведені дослідження щодо розробки препаратів на основі наночастинок металів для боротьби з антибіотикостійкими бактеріями [393, 437, 523]. Антимікробні властивості наночастинок обумовлені їх великим відношенням площі поверхні до об'єму, що дозволяє знищувати бактерії шляхом їх прямого щеплення без необхідності порушення клітинної стінки [55, 406, 523]. Вважається, що ця особливість знижує ймовірність толерантності до антибіотиків. Результати досліджень [56] показують, що всі штами *S. aureus*, виділені з клінічних і субклінічних випадків маститу, виявляють значну чутливість до AgNP і AuNP. При цьому наночастини срібла і золота при мінімальних інгібуючих концентраціях не були токсичними для щурів.

Доведено, що застосування розчину Полтавського бішофіту, який містить у своєму складі загальну концентрацію солей – $370 \pm 0,7$ г/л та іонів магнію – $8,6 \pm 2,04$ г/л коровам, хворим на мастит, сприяло підвищенню у крові кількості еритроцитів і гемоглобіну, а в сироватці крові іонів магнію. Отримані результати показали, що РПБ та гелевий препарат на його основі має перспективу щодо лікування корів, хворих на прихований мастит [3].

Крім того, нині багато досліджень спрямовані на вивчення наночастинок в якості носіїв антибактеріальних речовин для підвищення їх фармакологічної активності. Так, наприклад, активність антибіоплівкових і антибактеріальних засобів проти золотистого стафілококу можна посилити ліпосомами з левофлоксацином [157] і ліпосомами з цефтазидимом [219]. Подібно, ліпосоми дезоксихолевої кислоти, наповнені хлорамфеніколом ванкоміцином, мають антимікробну дію проти *MRSA* [78]. Також було доведено, що наногелі на основі еритроцитів нейтралізують токсини, пов'язані з *MRSA* у позаклітинному середовищі та стимулюють фагоцитоз бактерій макрофагами [462]. Проте, враховуючи патогенетичні особливості розвитку стафілококового маститу у корів, все ще необхідні подальші дослідження, направлені на пошук та створення безпечних, недорогих та ефективних наноформул.

Використання препаратів на основі прополісу, зібраного бджолами, також можуть бути альтернативною стратегією для боротьби з маститом у великої рогатої худоби [149, 150], оскільки вони недорогі, ефективні та нетоксичні для тварин і людей. До складу прополісу входять біофлаваноїди, ефірні олії, органічні кислоти, віск та мікроелементи. Цей природний препарат володіє антимікробною, протизапальною дією, а також сприяє стимуляції імунної системи [188].

Результати досліджень показали, що комплексне застосування препаратів Мастилін і Катовіл, до складу яких входить суміш органічних і високодисперсних систем, отримана шляхом настоювання прополісу у спиртовому розчині з наступним введенням наночастинок срібла, за лікування корів із субклінічною формою маститу має високу терапевтичну ефективність (100 %) та відновлення якості молока впродовж $3,1 \pm 0,6$ діб [15].

Проте, при застосуванні *in vivo* дослідники часто спостерігали алергічні реакції у тварин [188], що дещо ускладнює застосування таких препаратів [61].

Значну фармакологічну цінність для боротьби з патогенами мають йодовмісні з'єднання, особливо якщо йод знаходиться в біологічно активній

формі. Так, нині для лікування маститу у корів використовуються йодовмісні внутрішньоцистернальні препарати такі як Йодомастисан, Йодомаст, Йодомастин, Трансдермін, Септогель тощо. Так, наприклад при застосуванні трансдерміну як лікувального засобу при катаральному і катарально-гнійному маститі лактуючих корів за 3-денним курсом сприяло одужанню 100 % тварин івилікуванню 92,3 % часток вимені. Ефективність терапії при субклінічному і клінічно вираженому маститі сухостійних корів становила 87,5 % і 100,0 % відповідно [20]. Проте, використання йодовмісних речовин для лікування маститу може спричинити підвищення концентрації йоду в молоці шляхом прямого забруднення або всмоктування епітелієм вимені, в результаті чого молоко стає непридатним для будь-якого використання [491].

Молекули хітозану є природніми органічними речовинами, які виявилися ефективними щодо знищення золотистого стафілококу, виділеного від корів з ознаками маститу. Тим не менш, ці результати були суперечливими, особливо при дослідженнях на тваринах через ступінь полімеризації хітозану [58].

Регенеративна медицина – це відносно новий напрямок в медицині, який вивчає популяції стовбурових клітин або їх секретовані продукти для лікування різноманітних хворобливих станів як у людей, так і у тварин. Мезенхімальні стовбурові клітини (СК) є мультипотентними клітинами-попередниками, розташованими в різних тканинах, включаючи жирову. Дані багатьох досліджень вказують на те, що СК схожі з периваскулярними клітинами, відомими як перицити, які беруть участь у фізіологічній регенерації та утворенні нових капілярів. Хоча СК мають здатність диференціюватися на мезодермальні лінії, включаючи остеогенні, хондрогенні та адипогенні, їх терапевтичний потенціал заснований на продукції імуномодуючих, ангіогенних та антибактеріальних факторів [135]. Нещодавно повідомлялося, що кондеціоновані речовини, виділені з СК жирової тканини бичачого плоду, здатні викликати антипроліферативний ефект проти золотистого стафілококу, що спричинює мастит. Такий ефект

можна пояснити наявністю в цих речовинах антибактеріальних пептидів, дефензину $\beta 1$ та НК-лізину [126].

Вченими було досліджено вплив стовбурових кліти *in vitro* на епітеліальні клітини молочної залози, інфіковані *S. aureus* та *in vivo* у корів з гострим і хронічним маститом. Результати *in vitro* показали, що стовбурові клітини можуть послаблювати ріст бактерій: через 24 год культивування на *S. aureus* 89,67 % епітеліальних клітин молочної залози, оброблених стовбуровими клітинами, були все ще живими, тоді як усі клітини, культивовані без них, не вижили. При дослідженнях *in vivo* рецидиви хронічного маститу проявлялися значно менше у дослідній групі корів, яким вводили СК [64].

Дослідниками було також оцінено безпечність та ефективність алогенної інтрамамарної терапії на основі СК шляхом введення суспензії мезинхімальних стовбурових клітин жирової тканини плоду у кількості $2,5 \times 10^7$ на 1-й і 10-й дні експерименту здоровим тваринам та коровам, хворим на мастит. Протягом експерименту щодня відбирали зразки крові для визначення гемограми і виділення лейкоцитів периферичної крові та зразки молока для визначення вмісту соматичних клітин і загального мікробного забруднення. Результати досліджень показали, що дані маніпуляції не викликали клінічної або імунологічної відповіді у здорових корів та зменшували кількість бактерій у молоці корів із стафілококовим маститом. Загалом, ці результати є основою для потенційного розвитку терапії на основі СК для лікування маститу великої рогатої худоби [476].

Отже, на фоні розвитку резистентності до антибіотиків прискорюються та набувають значення нові стратегії та методи лікування бактеріальних інфекцій, в тому числі і маститів у корів, спричинених золотистим стафілококом. Проте існує велика різниця у терапевтичній ефективності цих засобів порівняно з антибіотиками. Загалом, існуючі альтернативи дають багатообіцяючі та обнадійливі результати, однак необхідно проводити подальші дослідження та пошук нових препаратів проти маститу, які активно

діють проти антибіотикостійких штамів бактерій, в тому числі золотистого стафілококу.

1.4. Фармакотерапевтичний потенціал бактеріофагів при боротьбі з маститом у корів

Бактеріофаги – це віруси, які уражають бактерії. Цю особливість фагів можна використовувати для лікування інфекцій, спричинених бактеріями [36, 46, 298, 429]. Фагова терапія відома з кінця дев'ятнадцятого століття, відразу після відкриття бактеріофагів [430]. Проте, прогресивне і масове використання антибіотиків сприяло нехтуванню терапевтичного потенціалу фагів. У таких країнах, як Грузія та Польща, фагова терапія залишалася активною до сьогоднішнього дня, в основному через два основних центри фаготерапії: Інститут бактеріофагів, мікробіології та вірусології імені Гліаши (Тбілісі, Грузія) та Інститут імунології та експериментальної терапії Людвіка Хіршфельда (Вроцлав, Польща) [411].

Внаслідок надмірного та неправильного використання антибіотиків, бактеріям вдалося розвинути численні механізми стійкості до них [180, 360]. Останні звіти стверджують, що щорічно в Сполучених Штатах реєструють понад 2,8 мільйона випадків розвитку інфекцій, спричинених бактеріями стійкими до антибіотиків). Якщо не вжити жодних заходів, за оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, стійкі до ліків інфекції можуть вбивати близько 10 мільйонів людей на рік до 2050 року [137]. Щоб уникнути такого загрозливого майбутнього, необхідні пошуки та розробка нових ефективних антибактеріальних сполук, і (бактеріальні) фаги можуть відігравати важливу роль у подоланні цієї глобальної кризи.

Незважаючи на всі задокументовані на сьогоднішній день випадки успішного лікування бактеріофагами, впровадження фаготерапії в західних країнах все ще стикається з серйозними перешкодами, пов'язаними з малою кількістю досліджень *in vivo* [238]. Нині дослідники прикладають великі

зусилля, проводячи широкомасштабні клінічні випробування для того, щоб фаготерапія стала доступною у всьому світі [99, 238].

Бактеріофаги широко поширені в природі і характеризуються яскраво вираженим тропізмом, тобто властивістю вражати клітини певного виду. Їх виділяють з води, ґрунту, різних харчових продуктів та з клітин тканин організмів людини і тварин [383, 544]. Нині виявлені і описані фаги проти різних видів бактерій, як патогенних так і сапрофітних, які здатні рости в аеробних і анаеробних умовах. Оскільки кожний бактеріофаг є специфічним паразитом бактерій окремого виду і розмножується тільки за їх рахунок то, відповідно, і фаги знаходять там, де живуть їх мікробні популяції. На даний момент не існує жодної відомої бактерії, яка б не могла бути ураженою бактеріофагом чи не несла у своєму геномі профаг (інтегровану нуклеїнову кислоту фага) [139].

Терапевтичний потенціал фагів підкреслювався в численних останніх дослідженнях, а специфічні переваги фаготерапії над антибіотикотерапією є досить значними. За даними [430] вони включають:

- здатність розмножуватися *in situ* під час антибактеріального лікування: фаги під час процесу знищення бактерій здатні розмножуватися саме там, де знаходяться їх клітини-господарі;
- загалом низька токсичність фагів, які використовуються для лікування: оскільки фаги складаються здебільшого з нуклеїнових кислот і білків, вони за своєю природою нетоксичні. Однак фаги можуть взаємодіяти з імунною системою тварини, що потенційно може призвести до шкідливих імунних реакцій. Тим не менш, дослідження показують, що реакція на введення бактеріофагових препаратів не спричиняє значних наслідків для організму вцілому;
- специфічність фагової мішені, яка може обмежити руйнування нецільових бактерій: завдяки цій властивості фага вони мінімально впливають на нормальну мікрофлору організму, в той час як антибіотики схильні до індукування суперінфекцій;

- здатність вражати антибіотикорезистентні або толерантні до антибіотиків патогени: оскільки фаги заражають і вбивають за допомогою механізмів, які відрізняються від антибіотиків, специфічні механізми стійкості до антибіотиків не перетворюються на механізми фазорезистентності. Таким чином, фаги можна легко використовувати для лікування стійких до антибіотиків інфекцій, наприклад, таких як *S. aureus*;

- типова легкість виявлення фагів як агентів з новою антибактеріальною активністю: фаги легко виділяти, часто з стічних вод та інших відходів, які містять високі концентрації бактерій. Однак, їх ізоляція може бути технічно важкою через велике різноманіття та особливості культивування самих бактерій-господарів;

- універсальність застосування: фаги, як і антибіотики можуть бути універсальними з точки зору рецептур, наприклад синергічно взаємодіяти з іншими антимікробними речовинами. Вони також універсальні при виборі форми застосування: рідини, мазі, креми, гелі, просочені тверді матеріали тощо. Крім того, фаги можна змішувати як «коктейлі» для розширення їх антибактеріального спектру активності;

- антибіоплівкова властивість: бактерії в біоплівці, як правило, значно більш стійкіші до антибіотиків, ніж планктонні форми. Проте фаги мають потенціал активного проникнення в структуру біоплівки шляхом її лізису, через дію деполімераз, що розкладають екзополімер біоплівки.

Бактеріофаги використовують два основних типи реплікації: літичний і лізогенний цикли [421]. Під час літичного циклу вірус перериває фізіологічний метаболізм бактеріальної клітини, щоб полегшити виробництво потомства бактеріофага. Після реплікації вірусу інфекція призводить до лізису бактеріальної клітини-господаря. Що стосується лізогенного циклу, то після адсорбції нуклеїнова кислота бактеріофага інтегрується з геномом бактеріальної клітини-господаря і виробляє профаг, де він передається наступним бактеріальним поколінням. Хімічні або фізичні фактори можуть активувати профаг, який може існувати в бактеріальній хромосомі, таким

чином запускаючи літичний цикл. Існує ще один тип реплікації бактеріофагів – це хронічний життєвий цикл, який відбувається у вірусів архей і деяких ниткоподібних і помірних фагів. Ці віруси не викликають руйнування або загибелі клітини, але замість цього новоутворені віріони постійно вивільняються з клітини. Інфіковані клітини-господарі здатні рости, але набагато повільніше [38, 430].

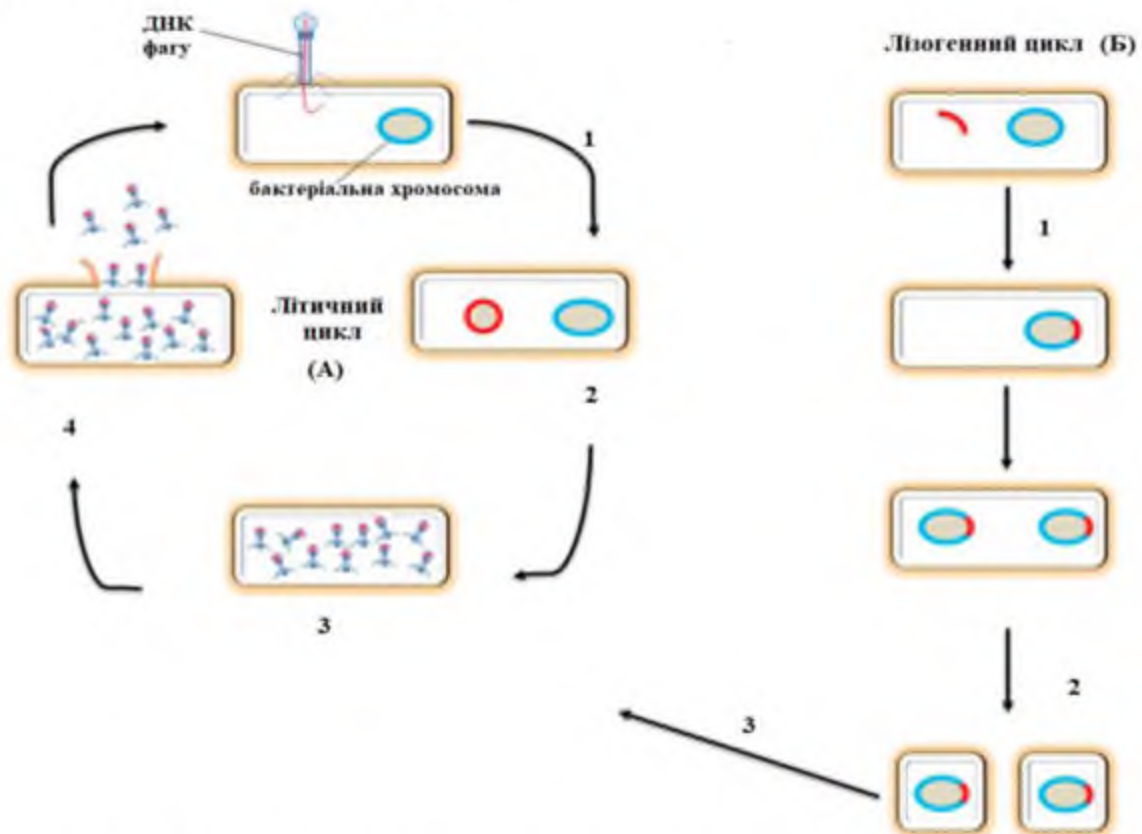


Рис. 1.1. Схема основних циклів реплікації бактеріофагів: А – літичний цикл: 1 – приєднання фага до клітини-господаря та введення ДНК, 2 – синтез вірусного геному та білків, 3 – утворення віріонів з нових фагових ДНК та білків, 4 – лізис бактеріальної клітини та вивільнення віріонів; Б – лізогенний цикл: 1 – інтеграція ДНК фага з геномом клітини-господаря, 2 – уражена бактерія розмножується як зазвичай, 3 – профаг може виділятися з геному господаря і вступати в літичний цикл [566].

Ключову роль у терапевтичному застосуванні відіграє саме літичний цикл реплікації фагу. Фактично, при фаготерапії використовують «фагові коктейлі» з літичних фагів, які під час експериментів *in vitro* виявляють літичну дію проти цільових бактеріальних патогенів [384].

Як правило, процес ураження бактерії фагом починається з його прикріплення до поверхні бактеріальної клітини через певні рецептори. Далі генетичний матеріал фага вводиться в цитоплазму бактеріальної клітини. Ініціація фагового втручання починається з розпізнавання між рецептор-зв'язуючими білками фага, які розташовані на кінчику хвоста та рецепторами на поверхні бактерії-господаря. Така специфічність безпосередньо пов'язана зі специфічністю адсорбції, яка корелює зі структурою клітинних рецепторів. Локалізація, розміри та кількість цих рецепторів відіграють ключову роль у процесі розпізнавання. Рецептори, які розміщені на поверхні клітини можуть включати білкові, ліпополісахаридні та рецептори, розташовані в капсульних полісахаридах тощо. Після успішного зв'язування з рецепторами господаря відбувається конформаційна зміна базової пластини фага, що призводить до скорочення оболонки та ін'єкції нуклеїнової кислоти вірусу в клітину [38, 566].

Для того щоб почався процес реплікації фага спочатку необхідно проникнути через вуглеводи, які присутні на поверхні бактеріальної клітини. До таких вуглеводів належать полісахариди, які здатні маскувати рецептори клітини-господаря та позаклітинні полісахариди, які можуть секретуватися під час продукування біоплівки. Фаги розробили різноманітні ферменти, наприклад деполімерази, що знаходяться на кінчику хвоста, які функціонують для розпізнавання, зв'язування, деградації вуглеводних компонентів та вільного доступу до рецептора бактерії [541, 282]. За механізмом дії фагдеполімерази можуть бути гідролазами або ліазами, кожна з яких викликає розпад полісахаридів на розчинні олігосахариди. Переважна більшість гідролаз є О-глікозними, які за допомогою молекул води розщеплюють зв'язки полісахариду. Для утворення розчинних олігосахаридів ліази розщеплюють глікозидний зв'язок шляхом β -елімінації, що не потребує використання води. До гідролаз входять сіалідази, які розщеплюють капсульну полісіалову кислоту і рамнозидази, які гідролазують О-антиген ліпополісахаридів. Ліази мають в своєму складі пектин-ліази, які здатні руйнувати позаклітинні

полісахариди, та гіалуронідази, які руйнують капсули на основі гіалуронату [97, 241].

Після завершення літичного циклу новоутворені віріони всередині бактеріальної клітини повинні її лізувати для вивільнення в навколишнє середовище. Хвостові фаги здійснюють цей процес за допомогою кодованого фрагменту ендолізину та холіну. Ендолізени – це ферменти, які розкладають пептидоглікан, синтезовані під час пізньої фази експересії генів. Під час літичного циклу ендолізени руйнують бактеріальну стінку зсередини. Каталітичні домени, які присутні в цих ферментах найчастіше проявляють мурамідазну або амідазну активність [241].

Для фагів, які інфікують грампозитивні бактерії ендолізін, як правило, є мономерним і глобулярним поліпептидом [386]. Ендолізени грампозитивних фагів зазвичай мають модульну структуру з каталітичним доменом, з'єднаним з доменом зв'язування клітини. Ендолізінам надається доступ до бактеріального пептидоглікану через холіни, які олігомеризуються в цитоплазматичній мембрані, створюючи невеликі пори, які дозволяють лізінам досягати своїх цілей. Для лізису, зазвичай, потрібна деградація зовнішньої мембрани клітини господаря. Цей процес забезпечується завдяки комплексу спаліну, до складу якого входить ліпопротеїн зовнішньої мембрани та інтегральний білок цитоплазматичної мембрани [385].

Клітинна стінка грампозитивних бактерій являє собою складну структуру, до якої входять різноманітні біополімери, включаючи пептидоглікани, полісахариди, тейхоеву кислоту та білки. Важливим компонентом клітинної стінки є пептидоглікани, які складаються з гліканових ланцюгів, з'єднаних короткими пептидними зв'язками. Вторинні полімери, включаючи тейхоеву кислоту, полісахариди чи білки, які містять рецептори полісахаридів, ковалентно пов'язані з пептидогліканами [113, 359]. Білки також можуть приєднуватися не ковалентно, а шляхом розпізнавання специфічних полімерів клітинної стінки. Ліпотейхоеві кислоти, які закріплені на клітинній стінці, сприяють функціонуванню клітинної мембрани. Фаги, які

інфікують бактерію, зазвичай використовують її вуглеводну частину на поверхні клітини-хазяїна як рецептор [526].

Фаготерапія, яка застосовувалася для лікування бактеріальних інфекцій у великої рогатої худоби, в основному була направлена на боротьбу з маститом.

Першим для лікування маститу корів був використаний бактеріофаг *K*, який спочатку проявив низький терапевтичний потенціал. Пізніше його властивості було переоцінено. Дослідниками [441] встановлено, що фаг *K* здатен знищувати золотистий стафілокок, який виділений із зразків госпіталізованих пацієнтів та проявляє стійкість до більшості антибіотиків. Також, доведено, що фаг *K* в аналізі *in vitro* здатний інгібувати ріст *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. chromogenes*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. caprae*, *S. hyicus*, виділених від ВРХ. Крім того, його фармакологічно-літична дія також була активна на штами *S. aureus*, стійкі до метициліну (*MRSA*), виділені в останні роки. Ця ж дослідницька група [318] виділила зі стічних вод ферми два інших бактеріофаги, які здатні лізувати *S. aureus*: *CSI* і *DW2*. Авторами був створений препарат на основі фагів *K*, *CSI* та *DW2* для внутрішньовименного введення.

Пізніше вченими [448] було виділено вісім помірних фагів золотистого стафілококу. Хоча вони не мали високого терапевтичного потенціалу, два з них було обрано для створення препарату проти маститу, спричиненого *S. aureus*. *FN5* і *FA72* увійшли до складу препарату у співвідношенні 1:1, оскільки разом проявили кращу протистафілококову активність. Тоді ж було підтверджено властивість сирого молока інгібувати ріст бактеріофагів. Дослідниками виявлено, що білки сирого молока зв'язують активні фагові віріони та перешкоджають ефективно пригнічувати проліферацію мікробів, в той час коли у молоці, підданому термічній обробці фагова інфекція активно прогресувала.

Відомий також бактеріофаг *MSA6*, який за морфологічними властивостями схожий на фаг *K*. Його особливістю є те, що він здатний

лізувати декілька штамів *S. aureus*, виділені від людей та великої рогатої худоби [143].

Дослідниками також було охарактеризовано бактеріофаг *SPW*, який вони виділили зі стічних вод молочної ферми. *SPW* здатний викликати ефективний лізис *S. aureus*, виділеного від корів з ознаками клінічного та субклінічного маститу, та показав відносно широкий спектр господарів. Крім того, він проявляв стійкість до змін рН та температури та був не чутливим до впливу ізопропанолу та хлороформу. Такі характеристики зробили його потенційним засобом для профілактики та лікування стафілококових маститів [345].

Враховуючи те, що молоко являє собою складне середовище полідисперсного характеру та складається з ліпідів, молочних білків, лактози, мінералів, мікроелементів та вітамінів необхідно проводити дослідження літичної дії бактеріофагів в умовах максимально наближених до умов *in vivo*. Так, нещодавно проведено дослідження щодо ефективності фагової суміші (літичні фаги *STAI.ST29*, *EBI.ST11* та *EBI.ST27*, специфічні щодо *S. aureus*) в пастеризованому та в сирому молоці з огляду на перспективне їх використання для лікування маститу корів. Результати цього дослідження показали, що додавання фагової суміші об'ємом 1 мл з концентрацією $1,2 \times 10^9$ БУО/мл до сирого молока, призводило до зниження золотистого стафілококу в середньому на 83,6 % через вісім годин порівняно з початковим значенням. Отримані дані свідчать про те, що для ефективної фагової терапії в умовах *in vivo* потрібно використовувати більш вищі концентрації бактеріофагів [213].

Проте такі обнадійливі результати використання бактеріофагів при боротьбі з стафілококовими маститами корів *in vitro* не гарантують ефективність фаготерапії *in vivo*.

Кількість досліджень *in vivo* щодо використання фагів для лікування маститу *S. aureus* у великої рогатої худоби досить незначна. Крім того, більшість експериментів *in vivo* проводилися не на коровах, які хворіли на мастит, а на моделі маститу у мишей. Встановлено [95], що *ΦSA012* і *ΦSA039*

мають літичний ефект у широкому діапазоні штамів *S. aureus*, виділених з молока маститних корів. Використовуючи модель маститу мишей дослідниками встановлено, що *φSA012* при внутрішньовименому введенні зменшує проліферацію *S. aureus* і, відповідно, знімає запалення в молочній залозі. Крім того, внутрішньовенне або внутрішньоочеревинне введення фага також знижує проліферацію золотистого стафілококу в молочних залозах.

Бактеріофаги, віруси, які інфікують і розмножуються всередині бактерій, ідеально пристосовані для інфікування біоплівок [202, 424]. Завдяки механізму спільної еволюції фаги беруть активну участь у формуванні біоплівки двома суперечливими способами, як промотори або як диспергуючі агенти. Фаги можуть бути оснащені ферментами, що руйнують матрицю і дозволяють ефективно інфікувати клітини, вбудовані в біоплівку [550]. У цьому контексті фаги є природною та корисною зброєю проти мікробних біоплівок, які стають багатообіцяючою альтернативою звичайним антимікробним препаратам [53, 240]. З іншого боку, профаги регулюють опосередкований фагами лізис клітин і вивільнення eDNA, важливий механізм стабілізації матриксу біоплівки [243].

Останім часом високий потенціал застосування фагів для знищення біоплівок, які утворені патогенними штамми з множинною стійкістю до антибіотиків, показують дослідження багатьох вчених [221, 358]. Як природні вороги бактерій, фаги ідеально пристосовані для руйнування біоплівок за допомогою різних механізмів, наприклад, руйнуючи позаклітинний матрикс, проникаючи в біоплівку та інфікуючи бактерії. Одним із таких механізмів є стимуляція бактерій-господарів до вироблення ферментів, що розкладають *EPS* [221]. Ці ферменти, індуковані господарем, розщеплюють полісахариди та білки в позаклітинному матриксі для полегшення проникнення фагів, реплікацію та елімінацію бактерій, присутніх у різних метаболічних станах, за допомогою літичної активності. Крім того, фаги можуть експресувати ферменти, що розкладають екзополісахариди (полісахариддеполімерази), які руйнують позаклітинні полімери шляхом перетравлення полісахаридної

матриці та білків у біоплівці, яка оточує бактерії, а також полісахариди, що утворюють капсули та ліпополісахариди. Цей процес очищає бактеріальний захисний бар'єр, а потім дозволяє потраплянню фагових частинок у біоплівку для реплікації всередині бактерій [100, 521]. Високі швидкості реплікації фагів виникають через високу щільність бактерій у структурі біоплівки. Індукований фагом бактеріальний лізис призводить до вивільнення нащадків, оскільки вони досягають локального лізису чутливих клітин, а пов'язані ферменти послаблюють стінку бактеріальної клітини та руйнують *EPS* у біоплівці [281]. Літичні фаги зберігають активність проти персистуючих клітин із зниженою метаболічною активністю. Лізогенні фаги також можуть інтегруватися в геном бактерій, змушуючи бактерії плавати природним чином, не прилипаючи до поверхонь, щоб ініціювати утворення зрілих біоплівок [353, 422].

Захисні механізми біоплівок можуть протистояти фаговій інфекції, впливаючи на адсорбцію фагів, проникнення, дифузію та проліферацію всередині утворених біоплівок [281]. Такі фактори, як структура і товщина матриксу біоплівки, вік біоплівки, фізіологічна гетерогенність у межах біоплівки, а також види або штами бактерій, які утворюють біоплівку в багатовидовому стані, можуть обмежувати фагове зараження та активність біоплівки [96]. Іншим цікавим механізмом запобігання інфікуванню фагів є специфічне розпізнавання нуклеїнових кислот фагів і їх знищення. Бактерії використовують систему рестрикції-модифікації (RM), систему захисних островів, пов'язану з модифікацією рестрикції (DISARM), білки арнонавтів прокаріотів (pAgo) і груповані короткі паліндромні повтори (CRISPR) Cas9, які регулярно переміщуються, щоб запобігти зараженню фагом [93, 233]. В якості останнього бар'єру для фагової інфекції бактерії можуть використовувати абортивну інфекційну систему, яка призводить до загибелі інфікованої клітини, запобігаючи поширенню фагів через спільноту [494].

Однак, для подолання цих механізмів резистентності фаги розробили кілька стратегій [43]. Фаги оснащені специфічними ферментами, такими як

гідролази, ендолізини та деполімерази, щоб подолати структуру, товщину, склад і вік біоплівки з пов'язаним матриксом, а також структурними частинами бактеріальної клітини. Фаги можуть дифундувати через водні канали біоплівки та проникати у внутрішні шари біоплівки [334]. Фаги також можуть оборотно адсорбуватися на придатках рухливих бактерій, щоб проникати всередину біоплівки. Фаги можуть боротися з персистентними клітинами шляхом вивільнення внутрішньоклітинного матеріалу, який запускає метаболізм персистентних клітин для інфікування та реплікації фагів. Стратегії, за допомогою яких фаги рятуються від бактеріальної імунної системи, включають потенційний вихід із систем RM через відсутність сайту розпізнавання ендонуклеази в усьому геномі, отримання точкових мутацій у спейсерній послідовності та вироблення білка анти-CRISPR, який заважає системі уникнути CRISPR [513].

Взаємодія фагів з бактеріями часто розглядається як антагоністичний коеволюційний цикл. Появність фагів може сприяти активному утворенню біоплівки, оскільки вивільнення cDNA через опосередкований фагами лізис клітин профагами відповідає за горизонтальне перенесення генів, що викликає жорстку реакцію стабілізації матриксу біоплівки [225]. Взаємодія фага з бактеріями може спричинити зміни в матриксі біоплівки, що призведе до посилення адгезії біоплівки, вірулентності, дисперсії біоплівок, варіації колоній та толерантності до антибіотиків [513]. Завдяки механізму еволюції фаги можна розглядати як активних агентів у формуванні біоплівки в якості стимулюючих або деструктивних чинників.

За результатами численних досліджень вченими розроблено основні напрямки попередження розвитку та знищення біоплівки, які включають: використання штамів фагів та фагових коктейлів як антибактеріальних агентів, застосування генетично-модифікованих фагів для доставки антибактеріальних речовин у глибокі шари біоплівки, ерадикацію біоплівок за допомогою фагових лізисів та застосування бактеріофагів у комплексі з антибіотиками для підсилення антибактеріального ефекту (рис. 1.2) [152, 425].



Рис. 1. 2. Основні способи для видалення біоплівки за допомогою бактеріофагів.

Також було показано, що фаги ефективно видаляють бактеріальні біоплівки, у тому числі *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. coli* та інших основних патогенів, що викликають мастит молочних корів [254, 404].

Попередні дослідження продемонстрували, що фаги потенційно можуть видаляти та/або руйнувати біоплівки *S. aureus*. Дослідження показали, що фаги більш ефективні, ніж антибіотики у видаленні біоплівки [182, 225] та продемонстрували, що фаг *K* здатний ефективно порушувати цілісність біоплівок [162].

Хоча дослідниками одержано досить обнадійливі результати ефективності фаготерапії проти маститу корів, спричиненого золотистим стафілококом, розуміючи складну структуру та функціональні особливості молочної залози великої рогатої худоби та біологічні властивості патогенних збудників маститу, необхідні подальші дослідження спрямовані на обґрунтування застосування препаратів на основі бактеріофагів в умовах молочних ферм. Зокрема, для ефективного впровадження фаготерапії у боротьбі з маститом необхідно провести глибокі лабораторні дослідження щодо активності виділених фагів до бактерій, які перебувають у різних фізіологічних станах, з різними патогенними властивостями, з різною стійкістю до антимікробних препаратів.

1.5. Основні вимоги при розробці препаратів на основі бактеріофагів для лікування маститу у корів

Одним з ключових моментів успішного лікування бактеріофагами є якість та безпечність фагових препаратів. Для широкого застосування у гуманій або ветеринарній медицині препарати фагів мають виготовлятися відповідно вимог нормативно-правових актів, затверджених регулюючими органами. Вважається, що виробництво препаратів на основі бактеріофагів має відштовідати нормам, які, зазвичай, застосовуються до фармацевтичних продуктів для забезпечення високих стандартів якості [201]. Проте, до сьогодні спеціальних документів, які б регулювали виготовлення бактеріофагових препаратів немає [391].

Починаючи з 2011 року, в Сполучених Штатах Америки препарати бактеріофагів почали розглядатися як лікувальні препарати. В той же час, згідно класифікації Європейського агентства з лікарських засобів у ЄС препарати фагів визнано як лікарський засіб або речовину чи комбінацію речовин для відновлення, корекції або модифікації фізіологічних функцій шляхом здійснення фармакологічної, імунологічної або метаболічної дії [223]. Таку класифікацію було схвалено у 2015 році на семінарі САЛЗ, хоча дослідники, лікарі, мікробіологи та фармацевти, які працювали з фагами та були присутні на заході висловили думку, що така категоризація не відповідає дійсності. Після цього вони висловили пропозицію щодо необхідності створення нової нормативно-правової бази контролю якості та безпечності препаратів на основі бактеріофагів [238]. Раніше фаги класифікували відповідно до Європейської Директиви 2001/83/ЄС, як «лікарські засоби для людського використання, призначені для розміщення на ринку в державах-членах та підготовлених промисловим способом, або виготовлених методом, що включає промисловий процес» [192].

Нині відповідно до вимог Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації фармацевтичних препаратів для людського використання, куди входять США, ЄС та Японія шляхом гармонізації

нормативних вимог щодо якості, безпеки та ефективності лікарських засобів препарати фагів повинні:

- виготовлятися відповідно до вимог GMP та відповідати суворим стандартам і процедурам для забезпечення якості кінцевого продукту;
- фаги повинні бути ефективними і безпечними при всіх фазах клінічних досліджень;
- препарати фагів повинні мати реєстраційні документи, відповідно до яких вони виготовляються [223].

Попри це наразі не існує дозволу на продаж фагів у Європейському Союзі та США. Так, наприклад, у Франції дозвіл на маркетинг лікарських засобів надається Національним ANSM після оцінки досвід, поданого фармацевтичною промисловістю. Ці документи повинні містити результати клінічних випробувань, демонструвати ефективність та показувати співвідношення користь/ризик. Проте, через досить малу кількість клінічних випробувань препарати фагів не мають відповідних дозволів. Тому фаги в країнах ЄС, зазвичай, використовуються в контексті 37 статті Гельсінкської декларації [436]. У Сполучених Штатах пацієнтів можна лікувати фагами, дотримуючись методу екстреного дослідження нового препарату (eIND) [420].

Загалом поширена практика, коли лікарі після обґрунтування застосування фаготерапії для пацієнта з дозволу контролюючих органів надсилають зразок матеріалу для виділення патогенного штаму та проведення фагограми в дослідницьку лабораторію. Якщо один чи декілька фагів проявляють активність, з них виготовляють препарат, очищують та надсилають фармацевту або лікарю для подальшого застосування. Загалом висока специфічність фагів до бактерій передбачає наявність достатньо широкого розмаїття фагів. У випадках, коли активні фаги відсутні у доступних колекціях, дослідницькі лабораторії займаються виділенням нових фагів з навколишнього середовища. Часто при таких схемах дослідники стикаються з проблемами великої кількості науково-технічних етапів [251, 466].

Фаги – це досить динамічні утворення, які швидко розвиваються. Однією з проблем промислового виготовлення препаратів на їх основі є забезпечення стабільності готового продукту, адже вони виготовляються з участю живих бактерій. Тому виробники повинні не тільки ізолювати, характеризувати та очищати фаги, але і стабілізувати їх. Ще однією з перешкод, з якою стикаються фармацевти при виготовленні фагопрепаратів є здатність фагів до перехресного зараження при взаємодії з нецільовими бактеріями [237].

Таким чином, категоризація фагів, як промислового лікарського засобу призводить до розбіжностей, оскільки для їх промислового виробництва необхідні великі колекції штамів фагів, з одного боку, та великі затрати фінансових і технічних засобів для відповідності отриманих препаратів виробничим стандартам GMP.

Проте за висновками більшості світових наукових центрів та лабораторій фагова терапія є альтернативою в лікуванні бактеріальних інфекцій, спричинених антибіотикорезистентними штамми бактерій, в тому числі і маститу у корів.

Загальноприйнятими вимогами до застосування бактеріофагів як лікарських засобів є їх антибактеріальна активність, титр віріонів, здатність викликати імунну відповідь, взаємодія з іншими лікарськими засобами, здатність зберігати літичну активність протягом тривалого часу [415].

Важливим чинником, який визначає антибактеріальну активність бактеріофагів є їх титр. Вченими було продемонстровано шляхом математичного моделювання та клінічних випробувань лінійну залежність між бактеріальним інгібуванням та кількістю фагових віріонів. Так, наприклад, при тестуванні препарату Puorhage® з титром 10^4 БУО/мл для стрептококів показники терапевтичної ефективності майже не відрізнялися у пацієнтів, які отримували плацебо (дане дослідження тривало з 2 червня 2017 року по 14 грудня 2018 року та зареєстроване в ClinicalTrials.gov, NCT03140085 [306]. На противагу цьому, в Центрі фагової

терапії Каліфорнії були отримані позитивні результати фаготерапії при внутрішньовенному застосуванні фагів з тиром 10^{10} БУО/мл без побічних ефектів, дані отримані при статистичному аналізі протягом двох років [340]. Крім того, та ж сама концентрація фага була успішно використана для внутрішньовенного застосування при лікуванні протезної інфекції колінного суглоба [426]. Хороші клінічні результати були досягнуті з використанням концентрації фага 10^9 БУО/мл при лікуванні пневмонії та емпієми, пов'язаної з вентиляцією легень [187].

Відомо, що фаги є імуногенними і спричинюють вироблення антитіл в організмі, які пригнічують їх антибактеріальну активність. Проте більшість дослідників при проведенні клінічних випробувань фаготерапії майже не приділяли уваги цій особливості. Зазвичай, у більшості випадків титри таких антитіл не корелювали з іншими показниками. Відомий випадок, коли пацієнтам внутрішньовенно застосовували фаговий препарат протягом 32 тижнів, при цьому у них виявили дуже слабку імунну відповідь, але без ознак фаgoneйтралізуючих антитіл [218]. Незважаючи на це, доступні дані досить обмежені. Тому клінічні випробування повинні включати моніторинг антитіл.

Іншою актуальною проблемою, яка може визначити успіх фаготерапії, є одночасне застосування фагів з іншими лікарськими засобами. Існує ряд досліджень, в яких показано позитивні результати при застосуванні бактеріофагів та традиційних антибіотиків. Наприклад, дослідниками [326] було показано, що субтерапевтичні концентрації антибіотиків можуть сприяти фаговій активності, а отже, зменшенню кількості бактерій. Повідомлялося, що за присутності пеніциліну посилюється фагова індукція. Також були повідомлення про стимуляцію розвитку фагів кишкової палички та золотистого стафілококу антибіотиками β -лактамного ряду [155, 519, 520]. Таке явище назвали синергією фаг-антибіотик (PAS). Проте, такий ефект спостерігали лише при деяких комбінаціях та він не був закономірним. З огляду на величезну різноманітність фагів, все ще існує багато недосліджених комбінацій фаг-антибіотик. Крім того, позитивний ефект лікування може

сильно залежати від умов лікування, наприклад дозування, частоти та порядку введення тощо. Таким чином, існує необхідність дослідження найбільш оптимальних взаємодій фаг-антибіотик для розробки оптимізованих антибактеріальних стратегій боротьби зі стафілококовим маститом корів.

Невід'ємною вимогою успішного лікування та регуляції фагів як фармацевтичних препаратів є їх стабільність. Потенційний штам бактеріофагу повинен максимально зберігати свою активність та титр під впливом факторів зовнішнього середовища, тобто під час виготовлення, транспортування та зберігання [249, 307]. Дослідниками було розроблено декілька стратегій для покращення стабільності фагів у препараті, це ліофілізація, полімеризація, емульгування тощо. Однак стабільність фагів у різних рецептурах (порошки, гелі, рідини) дуже варіюється, особливо серед їх різних типів [341, 361, 543]. Крім того, оскільки ефективність лікування в значній мірі залежить від концентрації фага в місці інфекції, тому важливо уникнути інактивації фагів під час власне лікування (рН середовища, зв'язуючі білки, тощо).

Ще одним питанням стабільності фагів є виникнення спонтанних мутацій у фагових лізатах, які зберігаються протягом тривалого періоду [304, 354, 461]. Хоча це складно, було б корисно передбачити еволюцію фагів під час виробництва щоб налагодити виробничий процес, який мінімізував би частоту мутацій у геномах фагів [432].

Незважаючи на майже відсутність документації щодо регулювання промислового виробництва препаратів на основі бактеріофагів, дослідники продовжують пошук нових фагів з терапевтичним потенціалом, адже фагова терапія може послабити постійно зростаючу проблему антибіотикорезистентності та бути альтернативою антибіотикам, або ж використовуватися в поєднанні з іншим фармацевтичними продуктами для підвищення їх ефективності. Проте, перед використання певного штаму фагу в якості антимікробного засобу потрібно провести його оцінку *in vitro* та встановити відповідність препарату існуючим вимогам GMP [114].

Отже, літературні дані вказують на великі можливості щодо застосування фагів для лікування різних захворювань, які спричиняються патогенними збудниками. Однак, ефективність даної терапії залежить від ряду чинників, які необхідно враховувати як при підборі фагу та розробці препарату, так і при безпосередньому його застосуванні на виробництві. Зокрема, до основних критеріїв, на які вчені звертають увагу, відносять необхідність використання тільки літичних фагів з високим титром у розробленому препараті а також на їх значну антибіоплівкову дію. Крім того, на нашу думку, заслуговує уваги у терапії рекурентних інфекцій, зокрема і маститу, які спричиняються високорезистентними збудниками – подання антибіотиків із фаговими препаратами для досягнення бактерицидного ефекту. Проведення досліджень у такому напрямі необхідно розвивати, так як вони мають перспективу.

1.6. Фармакокінетика та фармакодинаміка бактеріофагів в організмі тварини

Оскільки фармакокінетика та фармакодинаміка фагів знаходиться на ранніх стадіях дослідження, мало що відомо про оптимальне дозування та терапевтичні концентрації фага у вогнищі інфекції [134, 220]. Фармакокінетичні параметри, які в першу чергу впливають на ефективність фаготерапії – це титр фагових віріонів, шляхи введення лікарського засобу, швидкість адсорбції, елімінації та дифузії фагів. Так, підтримка високого титру фагів буде досить важливою при низькій швидкості адсорбції, інакше віріони можуть зруйнуватися, перш ніж інфікують нову клітину. Тому для оптимізації фаготерапії важливо знати швидкість адсорбції в умовах *in vivo* [400, 433]. Однак, позитивний ефект не настане, поки не буде достатньої концентрації препарату в місці ураження. При фаготерапії ці концентрації, тобто щільність фагів, можна досягти за допомогою двох способів: пасивного і активного. Пасивні методи фаготерапії забезпечують достатню кількість фагів для знищення цільових бактерій, тобто індуктивну

щільність, щоб знищити більшість цих бактерій для контролю інфекції навіть при відсутності виробництва нових фагових віріонів *in situ* [428]. Активне лікування фагами, навпаки, явно передбачає виробництво нових віріонів *in situ* [138, 401]. Для того, щоб активне лікування було успішним, має бути присутня достатня кількість бактерій, які здатні підтримувати великі розміри фагових вибухів для досягнення залишкової щільності фагів (рис. 1.3) [179].

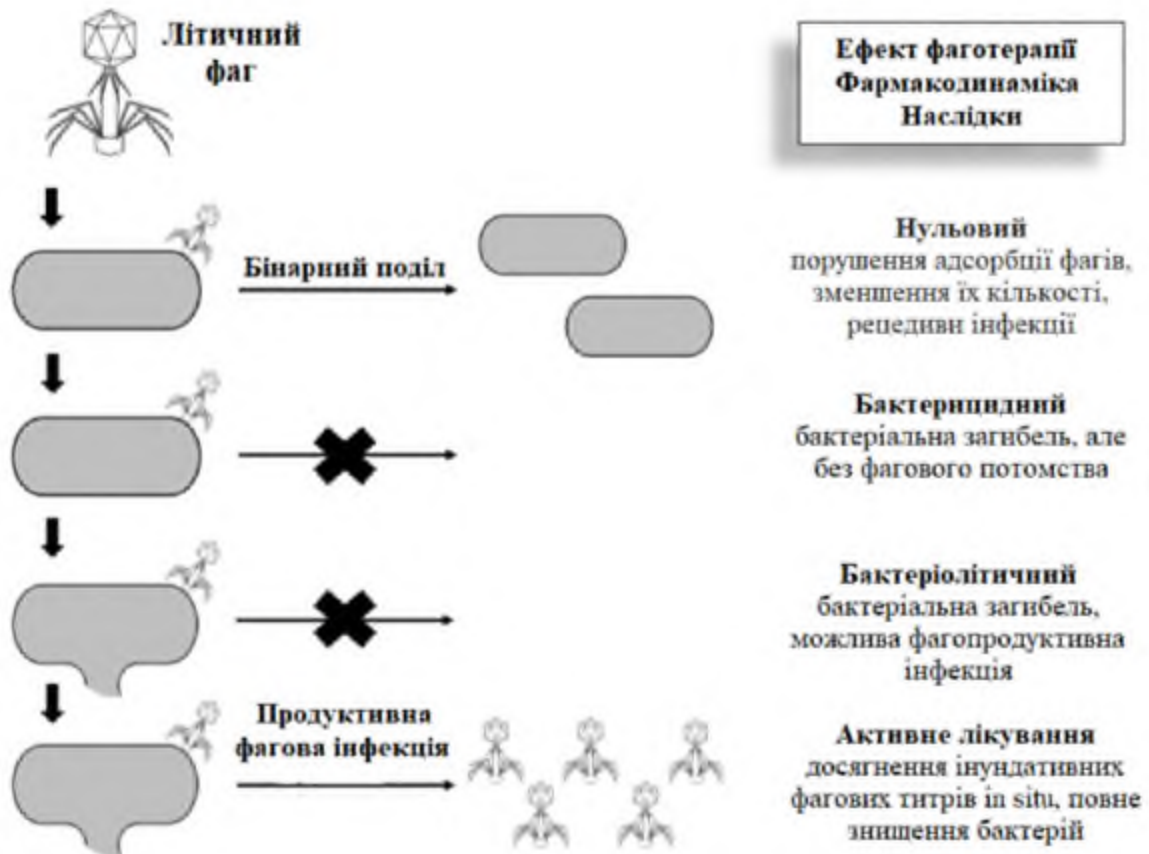


Рис 1. 3. Категорії фармакодинамічних ефектів фагової терапії [179].

Тому при розробці препаратів обов'язково необхідно враховувати даний показник для досягнення оптимального терапевтичного ефекту.

1.7. Підсумки з огляду літературних джерел

З літературних джерел, оглянутих у розділі 1, можна підсумувати наступне. У молочних стадах мастит корів найчастіше має субклінічний перебіг і в основному реєструється у лактаційний період. Збудники маститу

корів – це переважно бактерії із родів *Staphylococcus*, *Streptococcus*, у меншій мірі із родів *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*. На даний час основний метод лікування маститу корів – це з використанням антимікробних препаратів, зазвичай антибіотиків. Проте, мастит корів – це рекурентне захворювання, яке досить часто рецидивує і молочне скотарство зазнає значних збитків через недоотримання молока і його вибракування під час застосування антибіотиків. Крім того, переважаючий збудник маститу корів – золотистий стафілокок протягом останніх років швидко набуває стійкості до антимікробних препаратів, тому колись досить ефективна терапія антибіотиками стає малоефективною, а тварин необхідно вибраковувати. Літературні дані вказують, що науковці у всьому світі шукають альтернативні антибіотикам методи лікування і профілактики даного захворювання. Вказується, що фаготерапія може бути досить перселективним і актуальним методом лікування маститу, яка може вирішити декілька завдань одночасно, зокрема зменшення використання антибіотиків у тваринництві і, тим самим, знизити формування резистентних мікроорганізмів у навколишньому середовищі, які є резервуаром генів стійкості для більшості бактерій. Крім того, фаготерапія може зменшити витрати власників на вибракування молока під час лікування маститу. Проте, з даних літератури ми підсумовуємо, що на даний час для розроблення препаратів із фагами, специфічними до збудників маститу корів, необхідно підбирати літично активні фаги, а титр їх у препараті має бути досить високий, на рівні не нижче 10^6 БУО/мл. Також під час розроблення бактеріофагового препарату необхідно провести системні лабораторні дослідження щодо впливу його на персестери – збудники, які перебувають у сформованій біоплівці, адже мастит, особливо субклінічна його форма спричиняється біоплівковими формами золотистого стафілококу. Саме біоплівка захищає його від біоцидів і ускладнює терапію антибіотиками. Дані літератури повідомляють, що виділені фаги мають бути специфічні, саме до збудника маститу – золотистого стафілококу бичачого біотипу. Тому проведення досліджень має бути зосереджено на виділення фагів, які циркулюють на

молочній фермі в середовищі утримання молочного стада корів, краще від хворих маститом тварин або об'єктів, що контактують з такими тваринами чи молоком. Тому ми вважаємо, що планування дослідження з розробки альтернативних методів лікування маститу корів є завданням досить актуальним і перспективним, так як дозволить внести значний вклад у вирішення такої важливої проблеми як підвищення ефективності терапії маститу та зменшення розповсюдження у навколишньому середовищі антибіотикостійких збудників маститу.

РОЗДІЛ 2

ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконувалася на факультеті ветеринарної медицини та технологій у тваринництві Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» протягом 2017 – 2022 років. Виробничі дослідження проводили на базі ПП «Аграрна компанія 2004» МТФ с. Поляни, МТФ с. Ріпна, МТФ с. Соломна Волочиського району Хмельницької області, ТОВ «Козацька долина 2006» с. Вихрівка Дунаєвського району Хмельницької області, ТОВ «Лани Віньковеччини» смт Віньківці Хмельницького району Хмельницької області, ФГ «Молницьке» с. Молниця Герцаївського району Чернівецької області. Всього досліджено 1780 зразків секрету молочної залози корів, ідентифіковано та вивчено основні властивості 509 штамів роду *Staphylococcus*.

Основним напрямком роботи було експериментально розробити фаговий препарат Фагомаст та обґрунтувати використання фаготерапії за лікування корів хворих на мастит, як альтернативи антибіотикам. Схема проведення експериментів за темою роботи наведено на рис. 2.1.

На **першому етапі роботи** було проведено аналіз антибіотиків та внутріцестернальних протимаститних препаратів, які використовують для лікування маститу корів, вивчено поширення маститу на молочних фермах, збудників, які спричиняють запалення; досліджено антибіотикочутливість *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, визначено вплив антимікробних препаратів на планктонні форми бактерій та у складі біоплівки; досліджено мінімальні бактерицидні концентрації окремих антимікробних засобів щодо *S. aureus* як основного збудника маститу у корів, вивчено його патогенні властивості; досліджено поширення стійких до метициліну стафілококів на молочних фермах.



Рис. 2.1. Схема проведення досліджень дисертаційної роботи

Діагностику маститу корів, відбір проб молока і секрету молочної залози, доставку їх в лабораторію та мікробіологічні дослідження проводили згідно з загальноприйнятими методиками. Корів вважали хворими на мастит при виділенні збудників з секрету молочної залози (коагулазопозитивні стафілококи, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* та *E. coli*). Для виділення мікроорганізмів проводили посіви проб на середовища: стафілококів – *BD Baird-Parker Agar* (HiMedia, Індія); колиформних бактерій – агар Ендо (Фармактив, Україна), стрептококів – *Streptococcus Selection Agar* (HiMedia, Індія). Культивування проводили за температури 37 °С, результати оцінювали через 24–48 годин. Ідентифікацію чистих культур проводили за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями, які описані у визначнику бактерій Берджі [112]. Також ідентифікацію культур стафілококів проводили з використанням наборів «RapID Staph Plus» (Oxoid, Велика Британія).

Тварин обстежували на наявність субклінічного маститу за допомогою 2 % мастидину. Тварин вважали хворими субклінічною формою маститу, коли реакція з мастидином була оцінена у «-1+» і «++++». Визначення кількості соматичних клітин проводили методом Прескота-Бріда.

Чутливість ізолятів до антибактеріальних препаратів визначали диско-дифузійним методом, використовуючи диски з антибіотиками (HiMedia, Індія). При постановці методу використовували Mueller Hinton Agar (HiMedia, Індія). Визначення чутливості до протимаститних препаратів проводили луночковим методом.

Приготування мікробних суспензій проводили відповідно до оптичного стандарту мутності 1,0 одиниць за шкалою McFarland з використанням приладу Densi-LaMeter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія).

Для визначення здатності до формування біоплівки чисту культуру виділеного штаму висівали в лунки імунологічного планшета у кількості не менше ніж 10^5 КУО/мл. Планшет інкубували при 37 ± 1 °С протягом 3 діб. Якщо в цей період формувалася біоплівка - поверхневий чи придонний ріст у лунці,

що давав плівку, яка при видаленні середовища осідала на стінках, то штам вважали плівкутворюючим [32].

Для визначення щільності утворених біоплівок використовували 96-ямкові пластикові планшети. У лунку вносили 0,1 см³ добової культури мікроорганізмів і витримували 3 години при кімнатній температурі. Потім додавали 1 см³ м'ясного агару і інкубували при 37 °С 24 години. Після інкубації лунки тричі промивали фосфатним буфером, висушували і фіксували біоплівку. Потім фарбували розчином 0,1 % кристалічного фіолетового протягом 10 хв, знову промивали фосфатним буфером і сушили. У кожен лунку вносили 96^o етанол і добре прочили їх. Вимірювали оптичну щільність спиртового розчину для промивання спектрофотометрично при довжині хвилі 570 нм [32].

Електронно-мікроскопічні дослідження сформованих біоплівок на абіотичних поверхнях проводили на електронному растровому мікроскопі (РЕМ 106 И, Україна).

Вивчення чутливості мікроорганізмів, що перебувають у біоплівковій формі, до антибіотиків проводили на добових мікробних біоплівках, які вирощені у пластикових чашках Петрі. Після 24 год інкубації культур чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів стерильним фосфатним буфером і вносили 5 см³ свіжоприготовлених антибіотиків. Після експозиції антибіотики зливали, чашки триразово промивали стерильним фосфатним буфером, вносили 5 см³ стерильного 0,9 % розчину натрію хлориду і стерильним тампоном ретельно відмивали зі стінок і дна чашки мікробну біоплівку. Із чашок відбирали 1,0 см³ суспензії, готували ряд десятикратних розведень, проводили посів 1,0 см³ кожного розведення у чашки Петрі, заливали МПА та інкубували за температури 37^oС упродовж 24 – 48 год для визначення кількості бактерій.

Визначення мінімальної інгубуючої концентрації антибіотиків на планктонні та мікроорганізми які перебувають у біоплівковій формі проводили згідно стандартних методик [442, 534].

Для визначення патогенних властивостей *S. aureus* проводили тести на коагулазу, продукцію ДНК-ази, лецитинази, гемоліз [288].

Для виявлення ентеротоксинів штами культивували в 10 см³ поживного бульйону (Merck, Німеччина) протягом доби в аеробних умовах при 37 °С. Супернатанти бактеріальної культури збирали центрифугуванням при 4000 мкг протягом 10 хв. Для визначення ентеротоксинів стафілококу SEA, SEB, SEC, SED та SEE використовували тест-систему RIDASCREEN®SET A, B, C, D, E (R-Biopharm AG, Дармштадт, Німеччина). Аналіз проводили відповідно до методичних вказівок 4.2. 2429 – 08 «Метод визначення стафілококових ентеротоксинів у харчових продуктах». Середня нижня межа виявлення аналізу становила 0,1 мг/см³. Усі експерименти виконувались у триразовому повторенні.

Чутливість стафілококів до метициліну визначали за наступною методикою. Бактеріальну суспензію стафілококу готували з декількох колоній з однаковою морфологією на стерильному фізіологічному розчині (3 мл) і доводили до каламутності 0,5 за шкалою McFarland. Далі готували розведення 1:100 стандартного інокуляту і за допомогою мікропіпетки наносили краплю (10 мкл) на поверхню агару Мюллер-Хінтон з оксациліном. В якості контролю використовували агар без оксациліну (HiMedia, Індія). Також для визначення MRSA використовували хромогенне середовище Агар chromID MRSA (Biomérieux, Росія).

Другий етап роботи – виділення та дослідження бактеріофагів для створення прогимаститного препарату специфічного щодо *S. aureus var. bovis*. Проведено визначення чутливості культур золотистого стафілококу різного біологічного походження до комерційних препаратів бактеріофагів, які доступні на ринку України; визначено оптимальні методики для виділення бактеріофагів на молочних фермах, виділено та досліджено основні фізико-хімічні характеристики бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах, визначено вплив бактеріофагу *Phage SAyB14* на біоплівки, які сформовані

Staphylococcus aureus var. bovis, як самостійного антибактеріального агента та в комплексі з антибіотиками.

У культур, що належать до *S. aureus*, біотипи визначали використовуючи схему: визначення кольору пігменту, наявність бета-гемолізу, активність коагулази до бичачої плазми, утворення колоній на середовищі з кристалічним фіолетовим [366].

Визначення діапазону дії бактеріофагів щодо клінічних ізолятів мікроорганізмів проводили крапельним методом, використовуючи препарат «Бактеріофаг стафілококовий» («Микроген», Росія). З цією метою на поверхню МПА в чашках Петрі піпеткою наносили 3-4 краплі 18-24-годинної бульонної культури досліджуваних мікроорганізмів. Оптична щільність інокуляту складала 0,5 одиниць по МакФар-Ланд (контроль за допомогою денситометра), що відповідає $1,5 \times 10^8$ мікробних клітин/мл. Потім культури рівномірно розподіляли по поверхні середовища стерильним шпателем. Чашки із засіяними середовищами підсушували в термостаті протягом 15-20 хвилин. Після чого на поверхню середовища піпеткою легким дотиком краплі наносили досліджуваній фаговий препарат, нахилили чашку так, щоб краплі стекли, а потім інкубували при температурі 37 °С, оцінку результатів проводили через 18-24 годин. В якості контролю на поверхню шільного поживного середовища з культурою наносили стерильний живильний бульйон.

Оцінку ступеня лізису проводили по чотирьох хрестах, де «1-1-» – зливний (повний) лізис; «+++» – напівзливний лізис, ріст культури в зоні лізису; «+-» – наявність в місці нанесення краплі фага понад 50 колоній фага (плям лізису); «+» – наявність в місці нанесення краплі фага від 20 до 50 колоній фага; «- /-» – наявність в місці нанесення краплі фага менше 20 колоній фага; – повна відсутність лізису. Результати від «+++» до «-+-» враховували як позитивні реакції. Дослідження проводили в трьох повторах.

У якості господарів для культивування фагів, активних щодо *S. aureus var. bovis*, створена робоча колекція мікроорганізмів з польових штамів,

виділених на молочних фермах. Мікробіологічну обробку зразків для виділення *S. aureus* проводили з використанням BD Baird-Parker Agar (HiMedia, Індія) згідно стандартних методик. Ідентичність кожного бактеріального ізоляту як штаму *S. aureus* була підтверджена гемолізом на кров'яному агарі, реакції каталази, фарбуванням за Грамом, реакцію коагулази з використанням плазми кролика EDTA та посівом на середовище з кристалічним фіолетовим для визначення біотипу. Культури, необхідні для розмноження фагів, підтримувалися на МПА або МПБ.

Матеріалом для дослідження (виділення бактеріофагів) були зразки секрету молочної залози корів з ознаками маститу та стічні води. Зразки секрету великої рогатої худоби, які служили вихідним матеріалом для виділення фагів, відібрані безсистемно, при цьому зразки молока містили соматичні клітини не менше 400,000 тис/см³.

Досліджуваний матеріал засівали в МПБ. Одночасно в живильне середовище вносили 0,2 – 0,5 мл або повну бактеріальну петлю добової культури *S. aureus var. bovis*. Посіви ставили в термостат при 37 °С, на 18 – 20 годин.

Після інкубації вміст флаконів фільтрували через фільтри для звільнення від механічних домішок. Після цього вміст розливали в стерильні пробірки, центрифугували при 3000 об./хв протягом 30 хвилин. Надсад очищували від сторонньої мікрофлори використовуючи один із методів:

- для двоступеневої фільтрації використовували мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм (Sartorius, Німечина);
- пробірки прогрівали на водяній бані за температури 60–2 °С протягом 30 хвилин;
- діяли хлороформом. Для цього в пробірку вносили хлороформ в співвідношенні 1:10, струшували і витримували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин.

В подальшому виділення та отримання чистих ліній бактеріофагів проводили за методикою розробленою Oliveira et al. [458]. Досліджуваний

матеріал засівали в МПБ. Одночасно в живильне середовище вносили 0,2 – 0,5 мл, або повну бактеріальну петлю добової культури *S. aureus var. bovis*. Флакони з посівами ставили в термостат при 37 °С, на 18 – 20 годин. Після інкубації вміст флаконів фільтрували через фільтри для звільнення від механічних домішок. Після цього вміст розливали в стерильні пробірки, центрифугували при 3000 об./хв протягом 30 хвилин. Надосад очищували від сторонньої мікрофлори використовуючи двоступеневу фільтрацію: мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм (Sartorius, Німечина). Отриманий фаголізат досліджували на наявність фагів. Літичну активність бактеріофагів, а також морфологію негативних колоній вивчали за методом Грація. Для цього готували 1,5 % МПА і розливали в стандартні чашки Петрі по 25,0 – 30,0 мл. Агар підсушували в термостаті протягом 30 хвилин. Окремо готували 0,7 % МПА (напіврідкий), розливали його в пробірки і стерилізували звичайним методом. В пробірки з 0,7 % МПА розплавленим і охолодженим до 45° С додавали по 1 мл фаголізату і 0,2 мл добової бульйонної індикаторної культури. Вміст пробірок перемішували і наливали подвійним шаром в чашки Петрі з 1,5 % МПА. Посіви інкубували за температури 37±1 °С упродовж 18 – 24 год. Вивчення морфології негативних колоній проводили через 6, 10, 16, 24 години. Відзначали величину негативних колоній, форму, ступінь прозорості, характер країв колоній.

Для визначення тривалості латентного періоду використовували спосіб вивчення одиночного циклу розмноження фага [489].

Визначення спектру літичної активності бактеріофагів щодо клінічних ізолятів мікроорганізмів проводили крапельним методом. З цією метою на поверхню МПА в чашках Петрі піпеткою наносили 3 – 4 краплі 18 – 24-годинної бульйонної культури досліджуваних мікроорганізмів. Оптична щільність інокуляту складала 0,5 одиниць по МакФар-Ланд (контроль за допомогою денситометра), що відповідає $1,5 \times 10^8$ мікробних клітин/мл. Потім культури рівномірно розподіляли по поверхні середовища стерильним шпателем. Чашки із засіяними середовищами підсушували в термостаті

протягом 15-20 хвилин. Після чого на поверхню середовища піпеткою легким дотиком краплі наносили досліджуваній бактеріофаг, з кількістю не менше 10^8 БУО/мл, нахилили чашку так, щоб краплі стекли, а потім інкубували при температурі $37\text{ }^\circ\text{C}$. Оцінку результатів проводили через 18–24 годин. В якості контролю на поверхню щільного поживного середовища з культурою наносили стерильний живильний бульйон. Дослідження проводили в трьох повторях.

Для визначення впливу високих температур на активність виділених фагів готували розведення кожного штаму з розрахунку 10^5 БУО/мл. Кожне розведення поміщали у водяну баню за різних температур: 35 (контроль), 45, 55, $65\text{ }^\circ\text{C}$. Через кожні 10 хвилин проводили відбір певної аліквоти досліджуваних зразків, додавали тест-культуру і висівали методом двошарового агару. Чашки інкубували за температури $37\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 18-24 год. Дослідження проводили в трьох повторях.

Визначення здатності бактеріофагів зберігати свою активність з часом проводили наступним чином. Готували розведення з розрахунку 10^5 БУО/мл. Кожне розведення зберігали за різних температур: 0, 4, $8\text{ }^\circ\text{C}$. Через певні проміжки часу відбирали аліквоти зразків і відсівали їх методом двошарового агару. Чашки інкубували за температури $37\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 18-24 год. Дослідження проводили в трьох повторях.

Для визначення впливу рН середовища на активність фагів живильний бульйон було відкалібровано (використовуючи 1 М НСІ) відповідно до наступних діапазонів рН: 2, 4, 6, 8, 10, 12 і 14. Кожне розведення бактеріофагів додавали до відкаліброваного бульйону з розрахунку, щоб в кінцевому результаті вміст фагів був 10^5 БУО/мл. Зразки витримували при кімнатній температурі протягом 1 години. Потім відбирали аліквоти досліджуваних зразків додавали чутливу добову культуру і висівали методом двошарового агару. Чашки інкубували за температури $37\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 18 – 24 год. Дослідження проводили в трьох повторях.

Для визначення чутливості виділених нами бактеріофагів до дії хлороформу ми вносили в пробірки з фаголізатом (титр фагів 10^5 БУО/мл) хлороформ у співвідношенні 1:10. Оброблені пробірки постійно струшували та витримували при кімнатній температурі протягом 15, 30 та 45 хвилин. Контролем служили фаголізати необроблені хлороформом. Титр фагів визначали за методом Грація описаним раніше. Дослідження проводили в трьох повторах

Для оцінки впливу кількості життєздатних бактерій *Staphylococcus aureus var. bovis* на інтенсивність фагової інфекції, спричиненої бактеріофагом *Phage SAvB14* вносили 1 мл фаголізату з титром фагів 10^2 БУО/мл у 9 мл поживного бульйону з відповідною кількістю добової культури досліджуваних мікроорганізмів. Для оцінки впливу бактеріофагу *Phage SAvB14* на кількість життєздатних бактерій *Staphylococcus aureus var. bovis* вносили 1 мл фаголізату з титрами фагів 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} БУО/мл у 9 мл поживного бульйону з добовою культурою досліджуваних мікроорганізмів та витримували протягом 12 год. Через кожні дві години відсівали для визначення кількості *S. aureus*. Кількість життєздатних стафілококів визначали шляхом посіву їх на середовище BD Baird-Parker Agar (HiMedia, Індія) згідно методик описаних раніше.

При вивченні впливу бактеріофагу на сформовані біоплівки визначали оптичну густину біоплівки, кількість клітин стафілококів у біоплівці та титр бактеріофагів. Визначення кількості стафілококів у біоплівці після дії бактеріофагу проводили на молодих (24 годинних) та зрілих (72 годинних) біоплівках, які вирощені у пластикових чашках Петрі. Після 24 або 72 год інкубації культур, чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів стерильним фосфатним буфером і вносили 5 см³ бактеріофагу *Phage SAvB14*. Під час екслозиції протягом 32 години (через кожні 4 години) бактеріофаг зливали, чашки триразово промивали стерильним фосфатним буфером, вносили 5 см³ стерильного 0,5 % розчину натрію хлориду і стерильним тампоном ретельно відмивали зі стінок і дна

чашки мікробну біоплівку. Із чашок відбирали 1,0 см³ суспензії, готували ряд десятикратних розведень, проводили посів 1.0 см³ кожного розведення у чашки Петрі, заливали МПА та інкубували за температури 37°C упродовж 24 – 48 год для визначення кількості стафілококів. Поряд із дослідженням кількості клітин стафілококів у біоплівці через кожні 4 години відбирали змиви для визначення титру бактеріофагу за методом Грація.

Ефект комбінованого застосування фагу з антибіотиками оцінювали при одночасному та поетапному внесенні антибіотиків та бактеріофагу.

При визначенні дії антибіотику та бактеріофагу *Phage SAyB14* за одночасного застосування на відмиту 24-годину біоплівку, вносили 1 мл суспензії *Phage SAyB14* з титром 10⁵ БУО/мл і 1 мл антибіотику з відповідними концентраціями. Результати оцінювали через 24 години. Відмивання біоплівки від залишків антибіотиків та фагів проводили тричі стерильним фосфатним буфером. Після чого вносили 5 см³ стерильного 0,5 % розчину натрію хлориду і стерильним тампоном ретельно відмивали зі стінок і дна чашки мікробну біоплівку. Із чашок відбирали 1.0 см³ суспензії, готували ряд десятикратних розведень, проводили посів 1.0 см³ кожного розведення у чашки Петрі, заливали МПА та інкубували за температури 37 °C упродовж 24 – 48 годин. Контролем служили 24-годинні біоплівки, які піддавалися впливу ізотонічного розчину NaCl протягом 24-х годин.

При визначенні дії антибіотику та бактеріофагу *Phage SAyB14* за поетапного застосування для цього на відмиту 24-х годину біоплівку впливали бактеріофагом (10⁵ БУО/мл) протягом 12 год, наступні 12 год діяли антибіотиком. Відмивання біоплівки від залишків антибіотиків та фагів проводили стерильним фосфатним буфером. Подальші процедури з визначення кількості стафілококів проводили, як у попередньому досліді за одночасного застосування фагу і антибіотика.

При визначенні дії антибіотику на клітини стафілококу у біоплівці для цього впливали на неї певними концентраціями біоциду. Відмивання біоплівки від залишків антибіотиків проводили стерильним фосфатним

буфером. Визначення кількості життєздатних клітин стафілококів у біоплівці проводили аналогічно як у попередніх дослідах. Контролем служили 24-годинні біоплівки які піддавалися впливу 0.5 % розчину NaCl протягом 24 годин.

Титр бактеріофагів визначали за методом Грація у рідині (суміш бактеріофагу та антибіотику) після її видалення з чашки Петрі через 24 години впливу на біоплівки. Нейтралізацію антибіотиків проводили стандартними методами. Контролем служив титр бактеріофагу у рідині без антибіотиків після 24 годин дії *Phage SAvB14* на біоплівку. Всі дослідження проводили в трьох повторах.

Третій етап експериментальних досліджень включав визначення технологічних параметрів для створення препарату і використання Фагомасту з лікувальною метою корів хворих на мастит. Крім того визначали у новоствореного препарату гостру токсичність та вплив на гематологічні показники периферичної крові мишей. До того ж виявляли, як впливає дослідний препарат на життєздатність інфузорій та оцінку шкідливої (подразнювальної) дії на слизові оболонки очей кролика. Також досліджували вплив Фагомасту на показники крові здорових корів та корів, хворих на мастит. За цього визначали оптимальний титр бактеріофагу в препараті та проводили оцінку терапевтичного ефекту дослідного препарату при маститі у порівнянні з препаратами для інтрацистернального введення на основі антибіотиків.

Визначення токсичності препарату проводилось у лабораторії Тернопільської дослідної станції Інституту ветеринарної медицини НААН. Дослідження проводили згідно чинних методик [14]. Клінічні дослідження проводились згідно з етичними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 р).

Експериментальні дослідження проводили на білих мишах. Для досліду було взято тварини з середньою масою тіла 25 – 30 г, віком 18 – 20 тижнів.

Тварин утримували в приміщеннях з відповідними параметрами мікроклімату і розміщували в пластикових клітках з дротяними кришками. Тваринам давали їжу та воду *ad libitum*. Вони пройшли 8-денний карантин та 14-денну акліматизацію.

Обрахунок результатів проводили за методом Кербера. Дослід по визначення гострої токсичності тривав 14 діб. Протягом дослідження спостерігали за поведінкою тварин, фіксували кількість загиблих в кожній групі.

Для дослідження з визначення гострої токсичності препарату було сформовано 3 групи (дві дослідних та одна контрольна) по 8 тварини у кожній. Мишей дослідних груп перед введенням препарату витримували на голодній дієті близько 12 годин. Доза препарату для 1-ї дослідної групи складала 2 000 мг/кг, для другої 5 000 мг/кг. Вміст фагових частинок в 1 мл препарату складав 1×10^8 БУО. Тваринам контрольної групи задавали дистильовану воду.

Загальні клінічні спостереження проводились щодня. Оцінювали клінічні особливості, включаючи зміни серцево-судинної, дихальної, травної, сечовидільної систем. Спостереження за всіма тваринами на предмет захворюваності та смертності, проводили три-чотири рази на добу протягом 14-денного дослідження. Вага тіла тварин визначали безпосередньо перед початком досліджень, а також на 7 і 14 день. Гематологічні показники визначали на автоматичному гематологічному аналізаторі для ветеринарії HBVET-1 (SINNOWA, Китай) згідно рекомендацій виробника. Для визначення біохімічних показників крові мишей використовували напівавтоматичний біохімічний аналізатор BS3000M (SINNOWA Medical Science & Technology Co., LTD, Китай) згідно інструкції. Після 14 днів застосування препарату 18 мишей (по 6 з кожної групи) піддали етаназії та провели патрозити. Результати розтину всіх досліджуваних мишей порівнювали з результатами розтинів тварин контрольної групи. За іншими тваринами спостерігали протягом наступних 3-х тижнів.

При визначенні впливу препарату на життєдіяльність інфузорії використано паспортизований музейний штам *Tetrachylena pyriformis* WH-14.

Під час визначення токсичності фагового препарату Фагомаст дослідження проводили відповідно до методичних рекомендацій [255]. Зокрема, готували у стерильних пробірках розчини препарату по 2 мл з різною кількістю фагових частинок від 10^1 до 10^9 БУО/мл за кімнатної температури та вносили у приготувані розчини по 0,05 мл 72-годинної культури інфузорії із пептонного середовища. Через 0,5, 1 та 96 год відбирали стерильною піпеткою розчини для проведення мікроскопії (підрахування кількості інфузорій в камері Горяєва та встановлення рухливості клітин) – гострої та хронічної токсичності. Кожне розведення препарату проводили у трьохразовій повторності, а отримані результати піддавали статистичній обробці.

Оцінку шкідливої дії (місцево подразнюючу) створеного фагового препарату проводили на слизових оболонках очей кролика. Кожну концентрацію препарату закапували по 2-3 краплі у кон'юнктивальний мішок одного ока кролика, а друге око слугувало контролем. Препарат вносили двічі на день протягом 5 діб. На одну концентрацію використовували п'ять кроликів. Оцінку шкідливої (подразнюючої) дії розчинів фагового препарату на слизові оболонки ока кролика здійснювали відповідно параметрів, наведених в табл. 2.1 [14].

Для подальших клінічних випробувань препарат Фагомаст фасували у шприци по 10 мл для індивідуального використання, та зберігали в холодильнику. Стерильність препаратів кожної партії перевіряли шляхом інокуляції 1 мл в 5 мл стерильного м'ясопептоного бульйону, який інкубували при температурі $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ та спостерігали за помутнінням бульйону протягом 48 годин, після чого проводили відсів на чашки Петрі з м'ясопептонним агаром. Крім того, з кожної партії залишали один шприц, який після завершення дослідження повертали до лабораторії для підтвердження концентрації фагів.

Схема лікування корів препаратом Фагомаст включала інфузію 10 мл препарату, яку задавали після здоювання двічі на добу. Після інфузії молочну залозу масажували поступальними рухами вгору для кращого розподілення діючої речовини в залозі.

**Оцінка шкідливої дії нових речовин чи новостворених препаратів
на слизові оболонки очей кролика [14]**

А. Гіперемія кон'юнктиви та рогівки	
Судини гіперемійовані	1 бал
Окремі судини погано видно	2 бали
Дифузне глибоке почервоніння	3 бали
Б. набряк повік	
Слабкий набряк	1 бал
Виражений набряк з частковим виверненням повік	2 бали
У результаті набряку око закрите на половину	3 бали
У результаті набряку око закрите більш як на половину	4 бали
В. Виділення	
Мінімальна кількість в кутику ока	1 бал
Кількість виділень зволожує повіки	2 бали
Кількість виділень зволожує повіки та шкіру навколо	3 бали

Визначення показників крові проводили для здорових корів через 48 годин після застосування Фагомасту. Визначення показників крові для корів хворих маститом проводили через 5 днів після завершення лікування. Визначення показників крові проводили на автоматичному гематологічному аналізаторі для ветеринарії HBVET-1 (SINNOWA, Китай) та напівавтоматичному біохімічному аналізаторі BS3000M (SINNOWA Medical Science & Technology Co., LTD, Китай) згідно інструкції.

У крові обох груп корів визначали показники природної резистентності до і на 5 добу лікування: фагоцитарну активність нейтрофілів (ФА), бактерицидну (БАСК) та лізоцимну (ЛАСК) активності сироватки крові загальноприйнятими методами [228].

Визначення кількості соматичних клітин проводили методом Прескота-Бріда. Для цього проби сирого молока відбирали в окремі стерильні

лабораторні склянки. В лабораторії готували мазки, фарбували та проводили підрахунок кількості соматичних клітин. Для визначення кількості *S. aureus* використовували середовище BD Baird-Parker Agar (HiMedia, Індія). Культивування проводили за температури 37° C, результати оцінювали через 24–48 годин.

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) та ANOVA. Застосовували непараметричні методи досліджень (критерії Уїлкоксона, Манна–Уїтні). Визначали середнє арифметичне (\bar{x}), стандартну похибку середньої величини (SE). Дані представлені у вигляді \bar{x} –SE (середнє \pm стандартна похибка). Різниця між значеннями в досліді визначалася за допомогою критеріїв Тьюки (Tukey HSD). Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за $p < 0,05$ (з урахуванням корекції Бонферроні).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Аналіз антибіотиків та протимаститних препаратів щодо впливу на збудники маститу

Упродовж 2017 – 2021 років нами вивчено поширення маститів у корів на молочних фермах західного регіону України. Проаналізовано основні чинники, які спричинюють мастит у корів, досліджено патогенні властивості збудників маститу та їх антибіотикорезистентність. Всього досліджено 1780 зразків секрету молочної залози корів, ідентифіковано та вивчено основні властивості 509 штамів мікроорганізмів, віднесених до роду *Staphylococcus*.

3.1.1. Поширення основних збудників маститу корів, в тому числі золотистого стафілококу, на молочних фермах

Мастит залишається широко поширеним захворюванням молочного стада у всьому світі, при цьому мікроорганізми є основною причиною виникнення інфекції молочної залози. Етіологічний спектр збудників маститу дуже різноманітний, відомо більше 140 видів і підвидів потенційних патогенів, які можуть викликати запалення молочної залози. Розповсюдження патогенних мікроорганізмів, які викликають мастит, може відрізнятись в різних країнах, регіонах та навіть стадах [168, 204, 547]. У більшості розвинених країн проводиться реєстрація та облік етіології маститу та ветеринарних процедур на корів чи стада в загальній системі профілактики цього захворювання. Проте, в Україні дана інформація обмежена або реєструється лише на рівні стада. Тому перед нами стояло завдання оцінити поширеність клінічного та субклінічного маститу, визначити основні етіологічні чинники, які сприяють розвитку даного захворювання.

На рис. 3.1 наведено частоту виникнення різних форм маститу в корів, які реєстрували на молочних фермах західного регіону України.

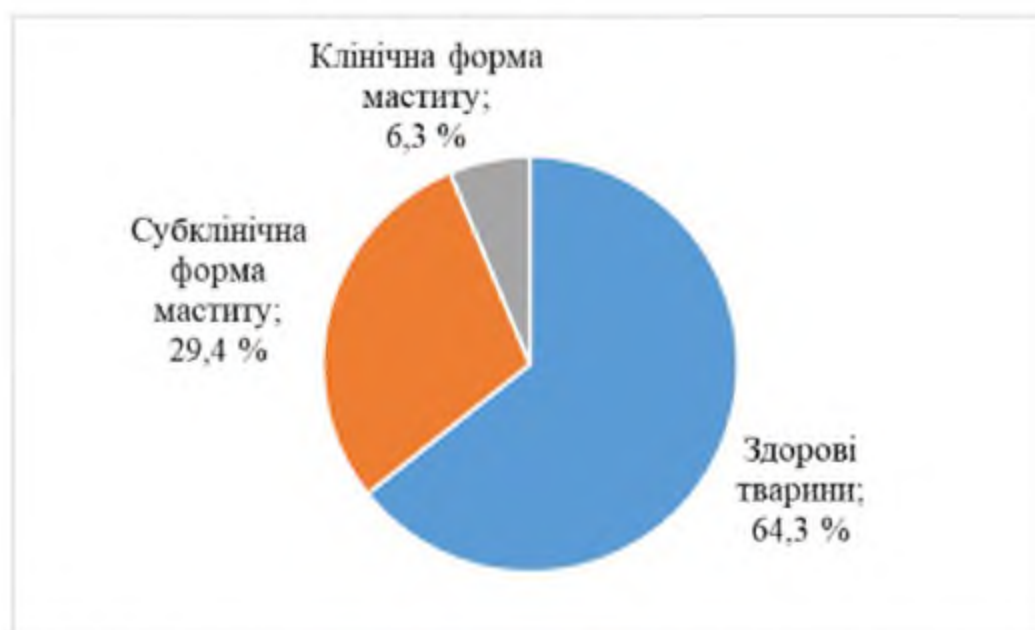


Рис. 3.1. Частота виникнення різних форм маститів у корів, n=1780

З даних рис. 3.1 видно, що найчастіше мастит діагностували у субклінічній формі – 29,4 % корів було уражено, в той час клінічну форму діагностували у 4,6 разів ($p < 0,05$) менше. Через відсутність явних клінічних проявів візуальна діагностика субклінічного маститу є дещо проблемною у ветеринарній практиці без застосування додаткових тестів. Тому необхідно постійно проводити діагностику прихованих форм захворювання молочної залози корів за допомогою швидких тестів (мастидиновий, каліфорнійський, тощо).

Оскільки визначення етіологічної ролі розвитку маститу у корів має важливе значення для ефективного лікування та контролю даного захворювання, ми визначили поширення збудників маститу корів на молочних фермах західного регіону України. Результати досліджень виникнення маститу у різні фізіологічні періоди корів наведено в табл. 3.1.

Як видно з табл. 3.1, кількість тварин з субклінічною формою маститу у період сухостою діагностувалася у 1,6 раза ($p \leq 0,05$) частіше, ніж у період лактації. Це пов'язано з тим, що у сухостійний період мало уваги звертають на стан здоров'я вимені корів. Практично не проводяться діагностичні

дослідження на мастит перед запуском корів, на 10 – 15 день сухостійного періоду та за 10 – 15 днів до родів.

Таблиця 3.1

Виникнення субклінічного маститу у різні фізіологічні періоди корів на молочних фермах західного регіону України, $x \pm SE$, n=1780

Фізіологічні періоди	Всього досліджено тварин		Кількість корів у яких діагностували мастит		Кількість хворих чверток, %	Наявність патогенних мікроорганізмів у хворих чвертках
	n	%	n	%		
Лактаційний період	1156	100	284	24,6 \pm 2,5	47,7 \pm 3,6	<i>Streptococcus spp.</i>
					45,5 \pm 1,9	<i>Staphylococcus spp.</i>
					6,8 \pm 0,4	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>
					62,5 \pm 3,3	<i>Streptococcus spp.</i>
Сухостійний період	624	100	240	38,5 \pm 3,8*	26,2 \pm 2,4	<i>Staphylococcus spp.</i>
					8,3 \pm 2,1	<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> + коліформні бактерії
					3,0 \pm 0,25	Коліформні бактерії

Примітки: * $p < 0,05$ по відношенню до лактаційного періоду; \dagger $p < 0,05$ по відношенню до маститу стафілокової етіології у період сухостою. n – кількість досліджених зразків.

У період лактації із секрету хворих чверток вимені корів найчастіше виділялися бактерії роду *Streptococcus* (47,7 %) та *Staphylococcus* (45,5 %), що свідчить про їх головну етіологічну роль у виникненні субклінічного маститу. У період сухостою субклінічний мастит корів стрептокової етіології діагностувався у 2,4 раза ($p < 0,05$) частіше, ніж стафілокової і, відповідно, становив 62,5 % випадків.

Також у період лактації та сухостою спостерігали наявність субклінічного маститу змішаної етіології (стрептококи, стафілококи, коліформні бактерії) відповідно в 6,8 і 8,3 % випадків. Коліформні бактерії, які

були виділені з секрету вимені сухостійних корів при субклінічному маститі, в асоціаціях з іншими збудниками та в монокультурі у 3,0 % випадків (коліформний мастит) були представлені *E. coli*.

При субклінічному маститі стрептококової етіології у період лактації в однаковій кількості проб секрету вимені (47,4 %) виділялися бактерії виду *S. agalactiae* і *S. dysgalactiae*, в меншій мірі *S. uberis* (5,2 %) (рис. 3.2). У період сухостою збудники *S. agalactiae* при субклінічному маститі стрептококової етіології виділялися з проб секрету корів у 1,3 раза менше ($p \leq 0,05$), *S. dysgalactiae* – у 1,2 раза ($p \leq 0,05$), а бактерії виду *S. uberis* – у 4,4 раза ($p \leq 0,05$) більше, ніж у період лактації.

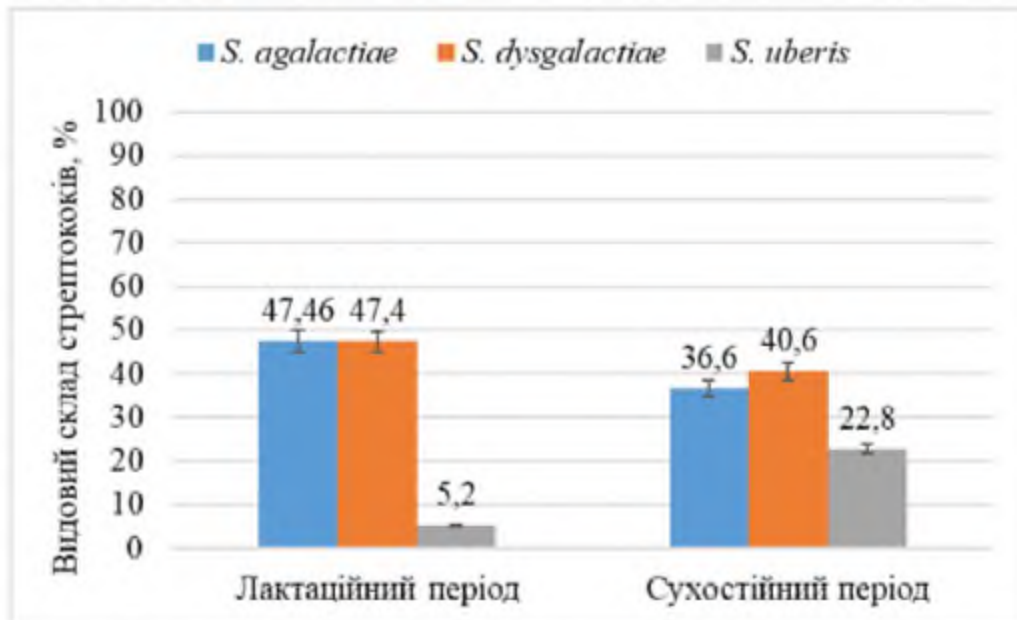


Рис. 3.2. Видовий склад мікрофлори секрету вимені корів при субклінічному маститі стрептококової етіології

Результати досліджень наявності стрептококів у секреті молочної залози та на шкірі дійок вимені здорових корів і хворих на субклінічну форму маститу в період лактації наведено в табл. 3.2.

Як видно з табл. 3.2, у корів, хворих на субклінічний мастит стрептококової етіології, у $26,7 \pm 3,5$ % шкіра дійок вимені була інфікована цими ж мікроорганізмами. У здорових корів у жодному випадку патогенних стрептококів у вимені та на шкірі дійок виділено не було.

**Контамінація молочної залози та шкіри дійок корів мікроорганізмами
роду *Streptococcus*, $\bar{x} \pm SE$, n=725**

Корови	Об'єкт дослідження	Всього досліджено зразків		Кількість зразків з вмістом стрептококів		Види стрептококів, які виділяються
		n	%	n	%	
Здорові	секрет вимені	154	100	51	33,1±4,2	<i>S. alactolicus</i> , <i>S. intestinalis</i>
	шкіра дійок	118	100	0		
Хворі на мастит	секрет вимені	285	100	285	100	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. uberis</i>
	шкіра дійок	168	100	45	26,7±3,5	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. uberis</i>

Примітки: n – кількість досліджених зразків

Результати досліджень видового складу мікрофлори секрету вимені корів при субклінічному маститі стафілококової етіології у період лактації наведено в табл. 3.3.

Як видно з табл. 3.3, на молочних фермах домінував коагулазонезитивний стафілокок, ідентифікований нами як *S. aureus subsp. aureus*. Власне, це той вид, який нами визначався як *S. aureus var. bovis*. Ми вважаємо за потрібне відзначити таку особливість: *S. aureus subsp. aureus* є основним збудником стафілококового маститу. Це підтверджується тим, що серед плазмокоагулюючих стафілококів, які виділялися з уражених маститом чверток, до виду *S. aureus subsp. aureus* відносилося 93,3 % культур. Така ж закономірність спостерігалася серед плазмокоагулюючих стафілококів, які виділялися зі шкіри дійок хворих чверток.

Видовий склад коагулазопозитивних стафілококів, які виділені від корів, хворих на мастит, %, $x \pm SE$, n=4022

Види стафілококів	Коагулазопозитивні стафілококи, виділені з:			
	секрету вимені		шкіри дійок	
	хворі чвертки, n=1680	здорові чвертки, n=764	хворі чвертки, n=1120	здорові чвертки, n=458
<i>S. aureus subsp. aureus</i>	93,3±2,01	81,6±2,33*	92,2±2,55	87,5±1,82
<i>S. hyicus</i>	2,9±0,41	10,5±0,94*	0,9±0,01	8,7±0,70*
<i>S. intermedius</i>	0,9±0,02	2,6±0,36*	1,7±0,12	1,25±0,05*
Не ідентифіковані культури	2,9±0,035	5,2±0,98*	5,1±0,51	2,25±0,36*

Примітки: * $p \leq 0,05$ – по відношенню до хворих корів; n – кількість досліджених культур.

Кількість бактерій *S. aureus subsp. aureus* у секреті здорових чверток зменшувалася у 1,1 раза ($p \leq 0,05$), відповідно спостерігали збільшення кількості мікроорганізмів *S. hyicus* у 3,6 раза ($p \leq 0,05$) та *S. intermedius* – у 2,9 раза ($p \leq 0,05$). Аналогічна ситуація спостерігалася з вмістом даних мікроорганізмів на шкірі дійок хворих на мастит корів.

З вище наведених результатів досліджень видно, що хворі корови на стрептококовий і стафілококовий мастит є основним резервуаром і джерелом зараження здорового стада.

Отже, результати досліджень підтверджують важливість контролю стану здоров'я молочної залози корів для проведення ефективних профілактичних і лікувальних протимаститних заходів.

Попередніми нашими дослідженнями встановлено, що одним з основних збудників маститу у корів є золотистий стафілокок. Особливістю даного патогену є його здатність утворювати щільні біоплівки [119], що

значно ускладнює антибіотикотерапію при запаленні молочної залози у корів. Крім того, нами встановлено, що резистентність до протимікробних засобів *S. aureus* з кожним роком зростає. Тому подальші наші дослідження направлені на визначення поширення цього мікроорганізму на молочних фермах західного регіону України та вивчення його патогенетичного потенціалу в етіології маститу.

Основним джерелом надходження золотистого стафілококу в молоко-сировину є шкіра дійок і секрет корів, хворих на різні форми маститу. Для з'ясування яка кількість стафілококів може надходити у молоко від здорових корів під час технології отримання молока у молокопровід, нами було проведено серію дослідів з більш детального визначення частоти обсіменіння і кількісного вмісту бактерій роду *Staphylococcus* та його найбільш патогенного виду *S. aureus* у змивах зі шкіри дійок, доїльного обладнання. Результати дослідження з визначення частоти виділення бактерій роду *Staphylococcus* зі шкіри дійок здорових корів наведено на рис. 3.3.

Як видно з досліджень, наведених на рис. 3.3, бактерії роду *Staphylococcus* постійно, у 100 % випадків виділяються зі шкіри дійок до і після доїння корів та через дві години після санації різними засобами. Водночас, вид *S. aureus*, в значно меншій мірі виділявся з даних біотопів. Зокрема, зі шкіри дійок корів до доїння перед її миттям його виділяли в 26,8±2,4 % випадків. Після обмивання шкіри дійок спеціальними засобами та після доїння у молокопровід у змивах зі шкіри *S. aureus* виділявся в 2,3 раза ($p<0,05$) менше, порівняно з частотою виділення до доїння. Дослідження змивів зі шкіри дійок через дві години після обробки виявило зменшення корів із наявністю *S. aureus* на даному біотопі до 4,1±0,3 %.



Рис. 3.3. Частота виділення бактерій роду *Staphylococcus* зі шкіри дійок здорових корів

Результати дослідження відносно кількісного вмісту бактерій роду *Staphylococcus* на шкірі дійок корів наведено на рис. 3.4.



Рис. 3.4. Кількісний вміст бактерій роду *Staphylococcus* на шкірі дійок здорових корів

З досліджень, наведених на рис. 3.4 видно, що найбільша кількість стафілококів виділялася зі шкіри дійок до доїння корів – $790,3 \pm 56,5$ КУО/см³

змиву. Переддоїльна обробка шкіри спричинила зменшення їх вмісту, зокрема, відразу після доїння кількість стафілококів зменшилася в 1,4 раза ($p < 0,05$), порівнюючи з кількістю до обробки. Проте, більш суттєво їх кількість зменшилася після застосування засобів для обробки вимені, так через дві години після обробки кількість стафілококів на шкірі дійок не перевищувала 150 КУО/см^3 змиву.

Кількість золотистого стафілококу на шкірі дійок корів до доїння була $283,5 \pm 21,2 \text{ КУО/см}^3$ змиву, що становить $35,8 \pm 0,3 \%$ від усіх виділених стафілококів. Після проведення переддоїльної обробки та доїння кількість *S. aureus* була в 2,1 раза ($p < 0,05$) менша, порівняно з вмістом до обробки. Післядоїльна обробка значно зменшила кількість золотистого стафілококу на шкірі дійок, так як їх кількість була в 10,3 раза ($p < 0,05$) менша, порівняно з вмістом до доїння.

Отже, з проведених досліджень видно, що на шкірі дійок здорових корів завжди наявні бактерії роду *Staphylococcus*, а золотистий стафілокок виділяється в проміжку між доїнням в $26,8 \pm 2,4 \%$ випадків. Перед- і післядоїльна обробка шкіри дійок антимікробними засобами значно зменшує частоту виділення золотистого стафілококу (до $4,1 \pm 0,3 \%$). Крім того, виявлено суттєве зменшення кількості золотистого стафілококу зі шкіри дійок після її санації (до $27,6 \pm 2,1 \text{ КУО/см}^3$ змиву). Таким чином, шкіра дійок за неналежної підготовки до доїння відноситься до вагомих джерел обсіменіння молока золотистим стафілококом.

Корови, хворі на мастит, завжди займали основне місце серед джерел забруднення молока золотистим стафілококом, особливо на фермах, де не проводяться своєчасні та ретельні протимаститні заходи, зокрема, доїння хворих тварин в окремий посуд. Результати дослідження обсіменіння шкіри дійок корів, хворих на клінічну і субклінічну форму маститу, наведено на рис. 3.5.



Рис. 3.5. Кількісний вміст бактерій роду *Staphylococcus* на шкірі дійок корів, хворих на стафілококовий мастит

З рис. 3.5 видно, що кількість стафілококів, в тому числі і золотистого, на шкірі дійок хворих на стафілококовий мастит значно більша в порівнянні зі змивами, відібраними від здорових корів. Також виявлено, що за субклінічної форми маститу кількість *S. aureus* на шкірі дійок була в 10,4 раза ($p < 0,05$) менша, порівнюючи зі шкірою корів, хворих на клінічну форму маститу. При цьому зі шкіри дійок, хворих на клінічну форму маститу, виділяли $8100,5 \pm 643,7$ КУО/см³ змиву. Значне виділення золотистого стафілококу зі шкіри дійок, хворих на мастит корів, вказує на необхідність обов'язкового дотримання окремого доїння маститних корів для недопущення контамінації обладнання і молока загального надою.

На рис. 3.6 показано результати дослідження обсіяння доїльного обладнання стафілококами.



Рис. 3.6. Частота виділення бактерій роду *Staphylococcus* з доїльного обладнання

Виявлено (рис. 3.6), що стафілококи виділялися з усіх досліджених проб доїльного обладнання після завершення процесу доїння. Водночас, золотистий стафілокок з даних проб виділявся практично в половині досліджуваних змивів – $51,4 \pm 3,9$ % випадків.

Санітарна обробка лужними і кислотними мийними засобами доїльної установки суттєво знизилася частоту виділення стафілококів. Зокрема, бактерії роду *Staphylococcus* виділялися у $25,3 \pm 1,9$ % випадків, що практично в 4 рази ($p < 0,05$) менше, ніж до обробки. Золотистий стафілокок реєстрували в $4,5 \pm 0,2$ % досліджуваних змивів з обладнання, що в 11,4 рази ($p < 0,05$) менше, ніж до санітарної обробки.

Отже, доїльне обладнання може бути джерелом обсіяння молока золотистим стафілококом лише за умови неефективної санітарної обробки.

На рис. 3.7 наведено результати досліджень щодо частоти виявлення та кількісного вмісту золотистого стафілококу з молока сирого, отриманого доїльною установкою АДМ-200.

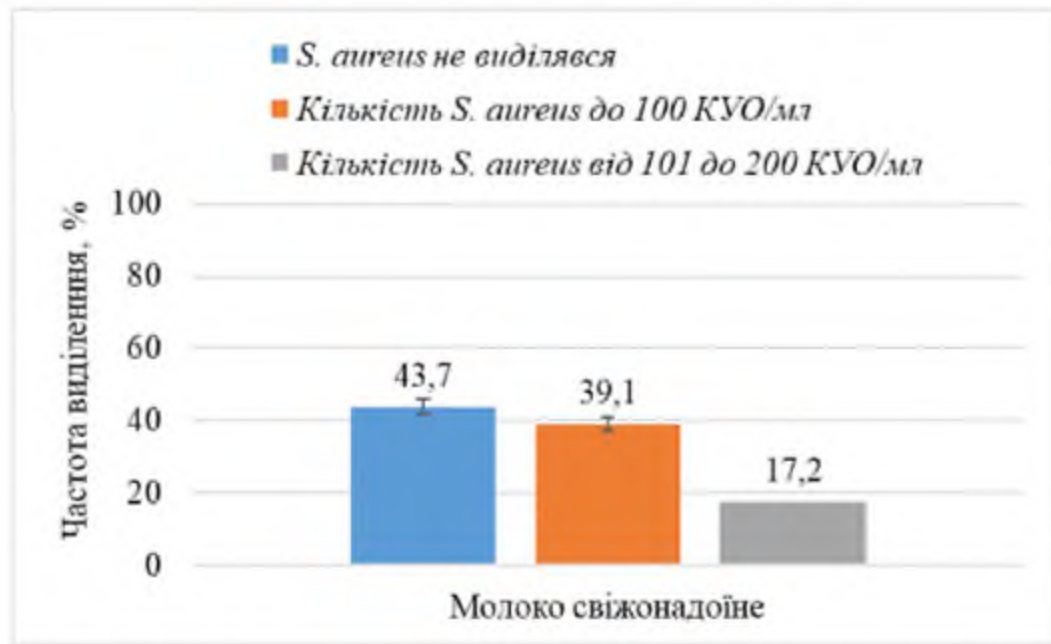


Рис. 3.7. Частота виділення бактерій роду *S. aureus* з молока свіжонадосного від здорових корів

Виявлено (рис.3.7), що у $43,7 \pm 3,9$ % проб молока сирого золотистий стафілокок не був виявлений в 1 см^3 . Кількість проб молока, які містили золотистий стафілокок до 100 КУО/см^3 становила $39,1 \pm 3,3$ %, і $17,2 \pm 1,4$ % проб молока були контаміновані золотистим стафілококом в кількості від 101 до 200 КУО/см^3 .

Отже, підсумовуючи можна відмітити, що навіть за використання засобів для перед- і післядоїльної обробки шкіри дійок корів та санітарної обробки доїльного обладнання з використанням лужних і кислотних мийно-дезінфікуючих засобів у молоці-сировині можлива наявність певної кількості золотистого стафілококу. На нашу думку золотистий стафілокок належить до автохтонної мікробіоти шкіри дійок вимені, наявність у молочній залозі та спричинення маститу пов'язано із технологією доїння молока. Проте, кількість *S. aureus* у свіжонадосному молоці від здорових корів не повинна перевищувати 200 КУО/см^3 . Виділення більшої кількості буде свідчити про неефективність протимаститних заходів, санації шкіри дійок та санобробки доїльного обладнання.

Матеріали даного підрозділу опубліковано в наукових працях:

Horiuk Y.V., Kukhtyn M.D., Perkiy Y.B., Horiuk V.V. Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 2018. Vol. 20 (83). P. 115–119. Doi: <https://doi.org/10.15421/nvlvet8322> [196];

Kukhtyn M., **Horiuk Y.**, Salata V., Klymyk V., Vorozhbit N., Rushchinskaya T. Staphylococcus aureus of raw cow's milk. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 2021. Vol. 23(102). P. 53–59. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10208> [504].

3.1.2. Вплив антибіотиків та внутрішньоцистернальних протимікробних препаратів на збудники маститу

Для лікування корів, хворих на мастит, найчастіше використовують антибіотики, асортимент яких весь час розширюється. Їх неконтрольоване використання призводить до появи антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів і неефективності застосування антимікробних препаратів.

Проблема застосування антибіотиків та формування мікроорганізмами резистентності до них є однією з найсерйозніших загроз глобальної охорони здоров'я, адже стійкість до антибіотиків зростає з кожним роком. Нині в тваринництві майже не проводиться моніторинг чутливості основних збудників маститу корів до сучасних антимікробних протимаститних препаратів, наявних на ринку України. Надмірне та нерациональне застосування антибіотиків вважається однією з основних причин поширення бактерій, резистентних до протимікробних препаратів. Негативним наслідком застосування антибіотиків для лікування маститу корів є наявність їх залишків у збірному молоці [457]. Також, проведення неефективного лікування захворювання сприяє надходженню мікроорганізмів у продукти харчування та передачі генів антибіотикорезистентності від збудників до нормо мікрофлори людей [178]. Нами було проведено визначення чутливості основних збудників

мастити корів ізольованих на молочних фермах до сучасних антимікробних препаратів, найбільш поширених у ветеринарній медицині (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Чутливість планктонних форм бактерій збудників маститу до антибіотиків, %, $\bar{x} \pm SE$, n = 182

Назва антибіотику, кількість діючої речовини	Досліджено культур			
	<i>S.</i> <i>agalactiae</i> , n = 53	<i>S.</i> <i>dysgalactiae</i> , n = 22	<i>S.</i> <i>aureus</i> , n = 81	<i>S.</i> <i>epidermidis</i> , n = 26
Бензилпеніцилін, 10 ОД	32,3	45,4	19,0	42,3
Амоксицилін, 30 мкг	41,2	68,2	35,7	57,7
Еритроміцин, 15 мкг	41,2	54,5	28,6	50,0
Стрептоміцин, 30 мкг	23,5	45,4	23,8	30,7
Гентаміцин, 30 мкг	58,8	59,0	30,9	42,3
Лінкоміцин, 10 мкг	38,2	59,0	47,6	57,7
Енрофлоксацин, 10 мкг	64,7	59,0	52,3	65,3
Цефтриаксон, 30 мкг	100	100	95,2	100
Доксициклін, 30 мкг	100	80,9	95,2	95,4
Тетрациклін, 30 мкг	23,5	22,7	11,9	26,9

З даних табл. 3.4 видно, що найефективнішим серед досліджених антибіотиків виявився цефалоспорин III покоління – цефтриаксон, до якого були чутливі усі виділені стрептококи та епідермальні стафілококи, а чутливість штамів *S. aureus* становила 95,2 %.

Чутливість планктонних форм бактерій до бензилпеніциліну становила від 32,3 до 45,4 %, в той же час *S. aureus* виявився стійкішим, так як кількість чутливих штамів становила всього 19,0 %. Протимікробна активність амоксициліну була вища, ніж бензилпеніциліну, так кількість культур

чутливих стрептококів коливалася в межах 41,2 – 68,2 %, а стафілококів – від 47,6 до 57,7 %.

Ефективність антибіотиків із групи аміноглікозидів (стрептоміцин, гентаміцин) дещо відрізнялася між собою. Найвища чутливість стрептококів була до гентаміцину (58,8 – 59,0 %), а до стрептоміцину чутливість становила в межах 23,5 – 45,5 %. Стафілококи до препаратів даної фармакологічної групи виявилися стійкішими, ніж стрептококи. Так, чутливість штамів *S. aureus* не перевищувала 30,9 %, а кількість культур *S. epidermidis*, які були чутливими до гентаміцину становила 42,5 %. Чутливість у стрептококів і стафілококів до еритроміцину не перевищувала 54,5 %.

Препарат енрофлоксацин проявляв стабільну бактерицидну дію на всі виділені штами стрептококів і стафілококів, чутливість їх становила 52,3 – 65,3 %. Слід відмітити досить високу протимікробну активність у антибіотика тетрациклінового ряду – доксицикліну. Кількість чутливих до даного антибіотику стрептококів коливався в межах 80,9 – 100 %, а чутливість стафілококів становила 95,2 %. У той же час, чутливість виділених бактерій збудників маститу до тетрацикліну була в 4,5 разів меншою, порівняно з доксицикліном.

Отже, результати визначення чутливості виділеної мікрофлори до антибіотиків мають важливе клінічне значення, оскільки дозволяють обґрунтувати вибір раціональної схеми антибіотикотерапії.

Крім того, нами проаналізовано результати чутливості основних збудників маститу, отримані у 2004 – 2005 роках та порівняно з 2019-2020 роками (табл. 3.5 та 3.6).

Як видно з табл. 3.5, безконтрольне застосування антибактеріальних речовин протягом 10 – 12 років на молочних фермах призвело до зниження чутливості у золотистого стафілококу збудника маститу практично в 2 – 3 рази ($p \leq 0,05$) порівняно з даними років 2004 – 2005 року. Лише один антибіотик доксициклін проявляв практично однакову згубну дію на усі культури золотистого стафілококу, які були виділені у 2019 – 2022 роках. Це

пояснюється нещодавньою появою даної антибактеріальної речовини у ветеринарній практиці.

Таблиця 3.5

Чутливість *S. aureus* – збудника маститу до антибіотиків, %, $\bar{x} \pm SE$, n = 148

Назва антибіотику, вміст діючої речовини в одному диску	Кількість досліджених культур	
	2004–2005 роки, n 67 [18]	2019–2020 роки n 81
Бензилпеніцилін, 10 ОД	72,0 \pm 3,11	19 \pm 1,52
Ампіцилін, 10 мкг	72,0 \pm 2,95	35,7 \pm 2,85
Еритроміцин, 15 мкг	100	28,6 \pm 2,57
Неоміцин, 30 мкг	88,0 \pm 2,56	30,9 \pm 2,47
Стрептоміцин, 30 мкг	100	23,8 \pm 1,90
Енрофлоксацин, 10 мкг	80,2 \pm 3,30	52,3 \pm 4,18
Тетрациклін, 30 мкг	100	11,9 \pm 1,07
Гентаміцин, 30 мкг	88,1 \pm 4,02	30,9 \pm 2,47
Амоксицилін, 30 мкг	100	35,7 \pm 3,21
Лінкоміцин, 10 мкг	100	47,6 \pm 4,28
Цефтріаксон, 30 мкг	–	95,2 \pm 8,56
Доксициклін, 30 мкг	–	95,2 \pm 8,56

Примітки. «–» – не досліджували; * – $p \leq 0,05$ – по відношенню до 2004–2005 років

Аналогічна ситуація спостерігалася щодо резистентності *S. agalactiae* збудника маститу, які були виділені на молочних фермах, до антибактеріальних речовин.

Чутливість *S. agalactiae* до антибіотиків, %, $\bar{x} \pm SE$, n = 89

Назва антибіотику, вміст діючої речовини в одному диску	Кількість досліджених культур	
	2004–2005 роки, n=36 [18]	2019–2020 роки, n=53
Бензилпеніцилін, 10 ОД	100	32,3±2,09*
Ампіцилін, 10 мкг	100	100
Еритроміцин, 15 мкг	100	41,2±3,29*
Неоміцин, 30 мкг	26,7±0,72	100
Стрептоміцин, 30 мкг	100	23,5±1,88*
Енрофлоксацин, 10 мкг	100	64,7±5,17*
Тетрациклін, 30 мкг	86,6±1,59	23,5±2,11
Гентаміцин, 30 мкг	50,0±1,62	58,8±4,70*
Амоксицилін, 30 мкг	100	41,2±1,13*
Лінкоміцин, 10 мкг	100	38,2±3,43*
Цефтріаксон, 30 мкг	100	100
Доксициклін, 30 мкг		100

Примітка: « » не досліджували; * p < 0,05 по відношенню до 2004–2005 років

Також нами було проведено дослідження з визначення чутливості патогенних мікроорганізмів до інтрацистервальних протимаститних препаратів (табл. 3.7).

Як видно із табл. 3.7, лише 27,3 % протимаститних препаратів для корів у період лактації проявляли бактерицидну дію до усіх виділених культур *S. aureus* і *S. agalactiae*. До 22,7 % протимаститних препаратів патогенні бактерії виявилися взагалі не чутливі. До решти препаратів чутливими були від 14,3 до 83,3 % виділених патогенних мікроорганізмів.

Чутливість мікроорганізмів *S. aureus* і *S. agalactiae* до протимаститних препаратів, %, $\bar{x} \pm SE$, n = 56

Назва препарату	Діюча антибактеріальна речовина	Дослідженні культури	
		<i>S. aureus</i> , n = 32	<i>S. agalactiae</i> , n = 24
Бровамаст 2 Д	Клоксацилін, ампіцилін	0	0
Амоклокс DC	Клоксацилін, ампіцилін	0	0
Декамаст	Декаметоксин	0	0
Маст БСН	Бензилпеніцилін, стрептоміцин	0	0
Клоксадев DC	Клоксацилін, ампіцилін	0	0
Мастомоке	Клоксацилін, амоксицилін	0	0
Дипромаст	Діоксидин, лінкоміцин	0	14,3±1,30
Маст НКС	Клоксацилін, неоміцин	0	16,7±1,28
Мастисан-А форте	Бензилпеніцилін, стрептоміцин	14,3±0,71	16,7±1,02
Гамарет	Бензилпеніцилін, неоміцин, дигідрострептоміцин, новобіоцин	28,6±0,89	33,3±1,01
Пенікан II	Бензилпеніцилін, канаміцин	33,3±1,40	42,8±1,65
Мультиджект IMM	Пеніцилін, стрептоміцин, неоміцин	33,3±1,03	42,9±1,32
Бровамаст I Д	Мастопред	50,0±2,33	57,1±2,11
Мастидев-Біо	Хлоргексидин, Бензалконій хлорид	50,0±1,84	57,1±3,05
МАСТИвет ПЛЮС	Амоксицилін	50,0±1,80	57,1±2,62
Біофлок DC	Енрофлоксацин	57,1±2,62	66,7±2,93
Мультимаст	Пеніцилін, стрептоміцин, неоміцин	57,1±2,62	66,7±2,02

Мастнет форте	Окситетрациклін, неоміцин	66,7±2,93	71,4±3,07
Масгилонг Форте	Тетрациклін, неоміцин, бацитрацил	71,4±3,44	83,3–2,90
Тетра-Дельта	Новобіоцил, неоміцин	100	100
Мастидев-Форте	Амоксицилін, Енрофлоксацин	100	100
Мастопред	Клоксацилін, ампіцилін	100	100
Профімаст	Цефалексин, гептаміцин	100	100
Мультибайт	Пеніцилін, стрептоміцин, неоміцин	100	100

Із трьох протимаститних препаратів для сухостійних корів лише до одного Біофлок DC на основі енрофлоксацину 57,1 % мікроорганізмів *S. aureus* і 66,7 % культур *S. agalactiae* проявляли чутливість.

Дані результати підтверджують те, що для ефективного проведення лікувально-профілактичних протимаститних заходів необхідне щорічне дослідження антибіотикограми до збудників маститу конкретного молочного господарства.

Матеріали даного підрозділу опубліковано в науковій праці:

Horiuk Y.V., Kukhtyn M.D., Perkiy Y.B., Horiuk V.V. Resistance of the main pathogens of mastitis of cows to modern antimicrobial drugs. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*, 2018. Vol. 6 (2). P. 49–53. [467].

3.1.3. Вплив антибіотиків на плівкоутворювальні бактерії – збудники маститу

Особливістю маститу у корів є високий ризик передачі збудників між тваринами та їх здатність зберігатися у вимені корів у формі субклінічної інфекції [476, 561]. Важливими факторами вірулентності патогенів є їх

здатність до адгезії, інкапсуляції в епітеліальних клітинах та утворенні біоплівки, яка перешкоджає лікуванню антимікробними препаратами та сприяє хронічній інфекції [128, 445, 476]. Тому нами проведено дослідження з визначення здатності формувати мікробні біоплівки збудниками маститів, які попередньо виділені на молочних фермах західного регіону України.

Встановлено, що мікроорганізми *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. aureus* та *S. epidermidis* є основними збудниками маститів корів на молочних фермах. Дослідження формування мікробних біоплівок у бактерій, виділених від хворих на різні форми маститу корів та при носійстві наведено в табл. 3.8 та 3.9.

Таблиця 3.8

Формування біоплівок збудниками за різних форм маститів, %, n = 182

Форми маститу	Вид мікроорганізмів							
	<i>S. agalactiae</i>		<i>S. dysgalactiae</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	n ₁ (%)	n ₂ (%)	n ₁ (%)	n ₂ (%)	n ₁ (%)	n ₂ (%)	n ₁ (%)	n ₂ (%)
Субклінічна, n = 84	184 (100)	120 (65,2)	94 (100)	65 (69,1)	214 (100)	207 (96,7)	117 (100)	100 (85,5)
Клінічна, n = 52	98 (100)	31 (31,6)	69 (100)	13 (18,1)	145 (100)	71 (48,9)	87 (100)	37 (42,5)
Носії, n = 46					154 (100)	154 (100)	59 (100)	50 (84,7)

Примітки: n – кількість досліджених проб секрету вимені корів; n₁ – кількість досліджених культур мікроорганізмів, n₂ – кількість культур мікроорганізмів, які утворювали біоплівки.

З даних, представлених в табл. 3.8 видно, що найбільшу кількість плівкоутворюючих штамів *S. aureus* виділяли при субклінічній формі маститу – 96,7%. При клінічній формі маститу кількість *S. aureus*, які утворювали біоплівки становила в 2,0 рази (p<0,05) менше. Аналогічну закономірність виявляли і при дослідженні інших збудників маститу. Вона характеризувалася тим, що при субклінічній формі кількість бактерій, які утворювали біоплівку

була в 2,0-3,8 раза ($p < 0,05$) більша, ніж при клінічній формі. Також дані таблиці вказують на те, що штами *S. aureus*, які є збудниками маститу корів, у 1,4-1,5 раза частіше утворювали мікробну біоплівку, ніж штами *S. agalactiae* і *S. dysgalactiae*. Це вказує на те, що лікування бактеріального маститу корів збудником якого є *S. aureus*, буде проходити важче, ніж при стрептококовому маститі.

Таблиця 3.9

Щільність біоплівок, сформованих збудниками маститу, %, $\bar{x} \pm SE$, n = 324

Щільність біоплівки	Кількість досліджених культур, які утворювали біоплівки			
	<i>S. agalactiae</i> , n = 86	<i>S. dysgalactiae</i> , n = 74	<i>S. aureus</i> , n = 98	<i>S. epidermidis</i> , n = 66
Слабка	61,6 \pm 4,2	37,8 \pm 3,5	–	24,2 \pm 3,4
Середня	24,4 \pm 2,7	56,7 \pm 5,4	12,2 \pm 2,3	57,6 \pm 4,2
Щільна	13,9 \pm 1,9	5,4 \pm 1,1	87,7 \pm 5,6	18,2 \pm 3,3

Примітки: n – кількість досліджених культур, які утворювали біоплівки; оптична густина розчину з біоплівки до 0.50 од – біоплівка низької щільності; від 0.51 до 1.00 – середньої щільності; від 1.01 до 1.50 – високої; 1.51 < дуже високої.

Встановлено (табл. 3.9), що *S. agalactiae* і *S. dysgalactiae* формували слабку і середньої щільності біоплівку у 86,0 – 94,5 % досліджених штамів і лише від 15,4 до 13,9 % утворювали щільні біоплівки. Водночас, практично 100 % штамів бактерій *S. aureus*, які були виділені із молочної залози хворих на мастит корів, формували щільні та середні біоплівки. У дещо меншій кількості утворював середні і щільні біоплівки штам *S. epidermidis* у 75,8=5,6 % випадків. Виявлено також, що штами *S. aureus* уже протягом 7 – 10 год. на абіотичних поверхнях утворювали щільні біоплівки.

На рис. 3.8 представлені результати електронно-мікроскопічних досліджень штамів *S. aureus* та *S. agalactiae*, які знаходяться у планктонній формі і біоплівці.

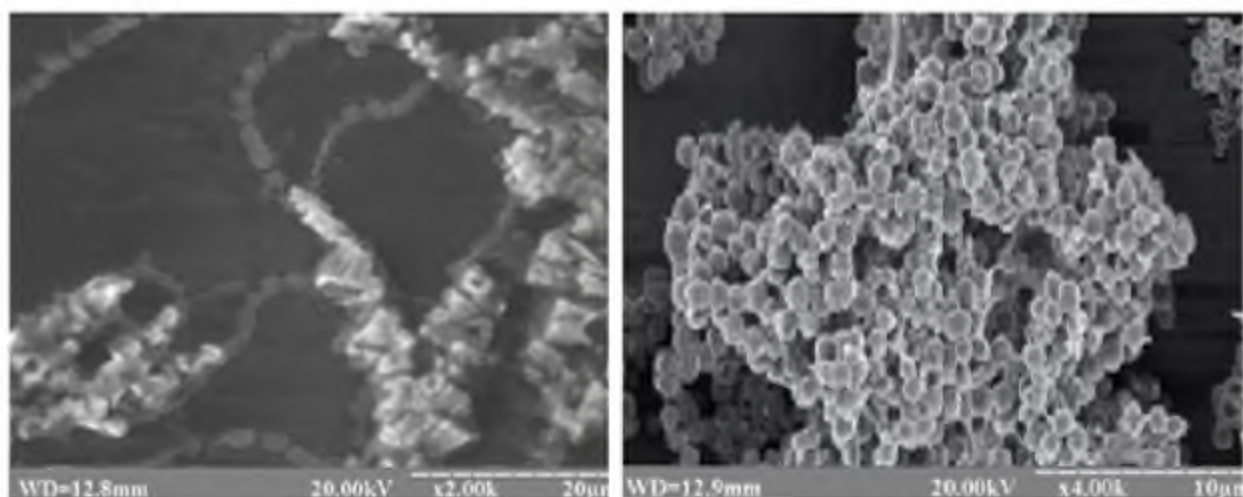
А – *S. agalactiae*Б – *S. aureus*

Рис. 3.8. Мікрофотографії бактерій збудників маститу, сформованих у біоплівки.

Аналіз мікрофотографій, які представлені на рисунку виявив, що бактерії, які перебувають у біоплівці мають об'ємну поверхню та суцільний матрикс, який захищає від несприятливих чинників.

Очевидно, перебування золотистого стафілококу у сформованій біоплівці в носіїв, а також у корів хворих на субклінічну форму маститу – це забезпечення його збереження, як виду, на молочній фермі. Спричиняти хворобу – це не основне завдання мікроорганізмів, які перебувають у сформованій біоплівці. Адже виникнення субклінічної форми маститу – це прояв факторної інфекції [267]. Загальновідомо, що взаємодія мікроорганізму та господаря залежить від резистентності останнього – рівня його місцевого та загального імунітету [327]. Біоплівкова форма мікроорганізмів забезпечує довгострокове виживання бактерій у корів-носіїв і перетворює їх в резервуар збудника. Вважається, що існуючи у матриксі біоплівки, бактерії практично недоступні до дії антибіотиків, не дивлячись на високу чутливість планктонних клітин до цих препаратів.

Таким чином, проведені лабораторні мікробіологічні дослідження вказують на те, що вивчення закономірностей формування біоплівки збудниками маститу корів є важливими для проведення ефективних

протимаститних заходів на молочних фермах та розроблення нових препаратів із специфічними властивостями, які будуть діяти на мікроорганізми у біоплівках.

Мікроорганізми здебільшого перебувають у біоплівках, а планктонна форма призначена для колонізації інших біотопів. Незважаючи на значну чутливість планктонних форм бактерій, виділених при маститі, до антибіотиків не завжди досягається позитивний результат під час лікування, оскільки в патогенезі субклінічної форми маститу провідна роль належить біоплівковим формам бактерій. Результати досліджень впливу антибіотиків на бактерії, які сформовані у біоплівки, наведено в табл. 3.10. У дослід взято штами бактерій, планктонні форми яких чутливі до визначених у досліді антибіотиків у диско-дифузійному методі Кірбі-Бауера.

Як видно з даних табл. 3.10, антибіотики проявляли бактерицидну дію до мікроорганізмів у мікробній біоплівці, проте мікробні клітини виявлялися життєздатними на рівні вище «порогу інфікованості». Найбільш захищені біоплівкою виявилися клітини *S. aureus*, а з досліджених антимікробних засобів найкраще впливає на клітини в біоплівці енрофлоксацин. Після його дії стрептококи і стафілококи з матриксу біоплівки не виділялися. Антибіотики пеніцилінового ряду проявляли найслабшу здатність впливати на бактерії у біоплівках. Після впливу бензилпеніциліну і амоксициліну кількість живих клітин стрептококів становила від $\lg 4,8$ до $5,5$ КУО/см² площі біоплівки, а стафілококи виділялися у кількості $\lg 5,0 - 6,0$ КУО/см² площі біоплівки. За умови дії антибіотиків аміноглікозидів і макролідів кількість мікробних клітин, що вижили, не перевищувала $\lg 5,3+3,2$ КУО/см² площі біоплівки. Досить ефективними на бактерії у біоплівках виявилися антибіотики цефтріаксон і доксициклін. Після дії цефтріаксону кількість бактерій, що вижила становила $\lg 1,9\pm 1,1$ КУО/см² площі біоплівки, а доксицикліну $\lg 2,5\pm 1,2$ КУО/см².

Вплив антимікробних препаратів на бактерії у складі біоплівки, Ig КУО/см², ($\bar{x} \pm SE$)

Назва антибіотику, кількість діючої речовини	Кількість клітин у біоплівці							
	<i>S. agalactiae</i>		<i>S. dysgalactiae</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	до дії антибіотика	після дії антибіотика	до дії антибіотика	після дії антибіотика	до дії антибіотика	після дії антибіотика	до дії антибіотика у	після дії антибіотика
Бензилпеніцилін, 10 ОД/мл	6,8± 4,3	5,5= 3,3	6,1±5,1	5,2±3,1	8,9±7,9	6,0±4,1	6,7±5,7	5,8= 3,8
Амоксицилін, 30 мкг /мл	6,8± 4,3	4,8= 3,4	6,1±5,1	5,0± 2,9	8,9±7,9	5,1= 2,7	6,7±5,7	5,0= 3,2
Стрептоміцин, 30 мкг /мл	6,8± 4,3	5,0= 3,1	6,1±5,1	5,1±2,7	8,9±7,9	5,3= 3,2	6,7±5,7	5,0= 3,1
Еритроміцин, 15 мкг /мл	6,8+ 4,3	4,5= 3,3	6,1±5,1	4,7+2,5	8,9+7,9	4,9+2,9	6,7+5,7	4,7+2,7
Гентаміцин, 30 мкг /мл	6,8± 4,3	4,2= 3,1	6,1±5,1	4,5± 2,2	8,9±7,9	4,8±2,9	6,7±5,7	4,6±2,5
Лінкоміцин, 10 мкг /мл	6,8± 4,3	4,7= 2,6	6,1±5,1	4,2± 2,0	8,9±7,9	5,1= 3,1	6,7±5,7	4,9= 2,2
Енрофлоксацин, 10 мкг /мл	6,8± 4,3	0	6,1±5,1	0	8,9±7,9	0	6,7±5,7	0
Цефтриаксон, 30 мкг /мл	6,8± 4,3	1,7= 1,2	6,1±5,1	1,4± 0,3	8,9±7,9	1,9±1,1	6,7±5,7	1,7= 0,7
Доксициклін, 30 мкг /мл	6,8+ 4,3	2,3= 1,3	6,1±5,1	2,0+ 1,1	8,9+7,9	2,5= 1,2	6,7+5,7	2,4+1,0
Тетрациклін, 30 мкг /мл	6,8± 4,3	2,5= 1,3	6,1±5,1	2,1± 1,2	8,9±7,9	2,8±1,4	6,7±5,7	2,6±1,3

Отже, проведені дослідження вказують на те, що бактерії збудники маститу, які сформовані у біоплівки, є більш стійкі до антимікробних препаратів, ніж планктонні форми. Оскільки мастит у корів здебільшого має хронічний перебіг, можна стверджувати, що мікроорганізми, що виділяються від хворих на мастит корів, перебувають у біоплівці й ускладнюють протимікробну терапію.

Матеріали даного підрозділу опубліковано в науковій праці:

Horiuk Y., Kukhtyn M., Kovalenko V., Kornienko L., Horiuk V., Liniichuk N. Biofilm formation in bovine mastitis pathogens and the effect on them of antimicrobial drugs. *Independent Journal of Management & Production*, 2019. Vol. 10(7). P. 897–910. Doi: <https://doi.org/10.14807/ijmp.v10i7.1012> [118].

3.1.4. Визначення мінімальної бактерицидної концентрації антибіотиків щодо *S. aureus*, які перебувають у планктонній та біоплівковій формах

Концентрація, яка необхідна для знищення біоплівкових форм мікроорганізмів, може перевищувати в тисячу разів необхідну для знищення планктонних бактерій того ж самого штаму [488]. Для більш глибокого розуміння вибору хіміотерапії при стафілококовому маститі нами було проведено визначення та порівняння мінімальної бактерицидної концентрації антибіотиків щодо впливу на планктонні і біоплівкові форми *S. aureus*, виділеного від корів, хворих на мастит в Україні.

Нами проаналізовано діючі антибактеріальні речовини у складі протимаститних препаратів та встановлено, що найчастіше фармацевти використовують антибіотики пеніцилінового ряду (пеніцилін, амоксицилін з клавулановою кислотою), фторхінолон – енрофлоксацин, тетрациклін та аміноглікозид – гентаміцин. Враховуючи дані аналізу, ці антибіотики було використано у подальших дослідженнях щодо впливу на планктонні і плівкоутворюючі форми *S. aureus*. Адже до типового захворювання, яке спричиняється мікроорганізмами (стафілококами, стрептококами, кишковою

та синегнійною паличками), що здатні формувати біоплівку, відносять субклінічну форму маститу [72, 555]. Нами спочатку було визначено МБК антибіотиків щодо планктонних форм *S. aureus*, які виділені від хворих на мастит корів (табл. 3.11). У дослід відібрано культури, які були стійкі до антибіотиків у диско-дифузійному методі.

Таблиця 3.11

**Мінімальна бактерицидна концентрація антибіотиків щодо
планктонних форм *S. aureus*, %, n =201**

Концентрація антибіотиків, mg/mL	Тетрациклін		Енрофлоксацин		Амоксицилін / клавуланова кислота		Гентаміцин	
	n -42	%	n -59	%	n -52	%	n -48	%
100	0	-	0	-	0	-	0	-
50	0	-	0	-	0	-	0	-
12,5	9	21,4	0	-	0	-	5	10,4
6,2	1	2,4	0	-	0	-	1	2,1
3,1	2	4,7	0	-	0	-	3	6,2
1,5	18	42,8	0	-	0	-	26	54,2
0,8	6	14,3	3	5,0	2	3,8	8	16,6
0,4	6	14,3	9	15,2	28	53,8	5	10,4
0,2	0	-	35	59,3	4	7,7	0	-
0,1	0	-	7	11,8	8	15,4	0	-
0,05	0	-	5	8,5	10	19,2	0	-

З даних табл. 3.11 видно, що найменша мінімальна бактерицидна концентрація, яка діяла на планктонні клітини *S. aureus* була у амоксициліну з клавулановою кислотою. При цьому МБК коливалася в діапазоні концентрацій від 0,05 до 0,8 мг/мл. У 19,2 % культур МБК становила 0,05 мг/мл, у більше половини культур (53,8 %) становила 0,4 мг/мл і тільки у 3,8 % культур – 0,8 мг/мл. Практично аналогічна МБК становила і в енрофлоксацину до даних планктонних культур *S. aureus*.

МБК антибіотиків тетрацикліну і гентаміцину на клітини *S. aureus* починалася з 0,4 mg/mL. Дія такої концентрації антибіотиків тетрацикліну і гентаміцину зупиняла розвиток 14,3 та 10,4 % культур *S. aureus* відповідно. У іншій частині мікробних культур МБК тетрацикліну і гентаміцину рівномірно зростала і за концентрації 1,5 мг/мл пригнічувала розвиток найбільшої кількості планктонних культур *S. aureus* 42,8 і 54,2 %. Найвища МБК даних антибіотиків, яка діяла на клітини *S. aureus* становила 12,5 мг/мл, за такої концентрації тетрацикліну і гентаміцину інгібувався ріст 21,4 та 10,4 % мікробних культур відповідно.

Другою частиною досліджу було визначити МБК вищевказаних антибіотиків на *S. aureus*, які сформовані у біоплівки, результати досліджень наведено в табл. 3.12.

Таблиця 3.12

Мінімальна бактерицидна концентрація антибіотиків щодо *S. aureus*, які сформовані у біоплівки, %, n =78

Концентрація антибіотиків, mg/ml.	Тетрациклін		Енрофлоксацин		Амоксицилін / клавулонова кислота		Гентаміцин	
	n=21	%	n=24	%	n=17	%	n=16	%
100	2	9,5	0	-	0	-	1	6,2
50	11	52,4	0	-	0	-	3	18,7
12,5	6	28,6	2	8,3	0	-	8	50,0
6,2	1	4,7	1	4,2	0	-	3	18,7
3,1	1	4,7	14	58,3	2	11,7	1	6,2
1,5	0	-	5	20,8	8	47,1	0	-
0,8	0	-	1	4,2	2	11,7	0	-
0,4	0	-	1	4,2	4	23,5	0	-
0,2	0	-	0	-	0	-	0	-
0,1	0	-	0	-	1	5,9	0	-
0,05	0	-	0	-	0	-	0	-

З даних табл. 3.12 видно, що МБК антибіотиків на клітини золотистого стафілококу, які сформовані у біоплівки в декілька разів вища, порівняно з планктонними формами даних культур. З поміж чотирьох досліджених антибіотиків, тетрациклін, енрофлоксацин, амоксицилін з клавулановою кислотою та гентаміцин, найефективнішим відносно впливу на клітини *S. aureus* у біоплівці виявився амоксицилін з клавулановою кислотою. У 5,9 % культур *S. aureus* МБК амоксициліну з клавулановою кислотою становила 0,1 мг/мл, а в більше половини культур – 58,8 % МБК становила від 1,5 до 3,1 мг/мл. Тобто, у більше половини культур *S. aureus* МБК на біоплівкові форми виявилася у 7,5 раза більшою, порівняно з МБК на планктонні форми.

У фторхінолону – енрофлоксацину найменша МБК, яка діяла на біоплівкові форми *S. aureus* становила 0,4 мг/мл, а це в 8 разів більша концентрація, порівняно з тою, що діяла на планктонні клітини. Найвища МБК енрофлоксацину на клітини *S. aureus* у біоплівці становила 12,5 мг/мл, що в 15 разів більша, ніж концентрація, яка діяла на планктонні форми. Практично, у більшій частині (58,3 %) культур *S. aureus*, який сформований у біоплівці, МБК становила 3,1 мг/мл, у такої кількості планктонних культур (59,3 %) МБК становила 0,2 мг/мл, що в 15,5 разів більша концентрація.

Найменш ефективними відносно впливу на біоплівкові форми *S. aureus* виявилися антибіотики тетрациклін і гентаміцин. Найнижча МБК даних антибіотиків, яка діяла на 4,7 та 6,2 % біоплівкових форм *S. aureus* становила 3,1 mg/mL, що 7,75 раза більше концентрації, яка зупиняла ріст планктонних клітин *S. aureus*. МБК тетрацикліну і гентаміцину від 12,5 до 50 мг/мл інгібувала ріст 70 – 80 % культур *S. aureus* у біоплівці, що в 8 разів більше концентрації, яка діяла на планктонні форми. Найвища МБК даних антибіотиків, яка зупиняла розвиток біоплівкових форм *S. aureus* досягала кількості 100 мг/мл.

Відомо, що бактерії у біоплівці під час дії антибактеріальних препаратів можуть перебувати у персистентній формі з низьким метаболізмом. У табл. 3.13 наведено результати досліджень щодо кількісного вмісту клітин *S. aureus*

у біоплівці після впливу антибіотиків у МБК, визначеній на планктонних формах.

Таблиця 3.13

**Вплив антибіотиків на кількість бактерій у складі біоплівки, Ig КУО/см²,
x ± SE, n = 81**

Концентрація антибіотиків, мг/мл	Кількість клітин <i>S. aureus</i> у біоплівці після дії антибіотиків у МБК, визначеній на планктонних формах			
	Тетрациклін, n 11	Енрофлоксацин, n 14	Амоксицилін / клавулонова кислота, n=8	Гентаміцин, n 48
12,5	2,8±1,2	0	0	2,8±1,4
6,2	3,6±2,5	0	0	2,8±1,7
3,1	5,5±4,5	0	0	4,3±3,2
1,5	5,9±4,8	0	0	4,9±3,8
0,8	7,0±5,9	2,1±1,5	1,8±1,3	6,0±4,9
0,4	7,2±5,5	4,6±3,5	4,2±3,1	6,3±5,1
0,2	0	5,1±4,0	4,9±3,9	0
0,1	0	5,9±4,8	5,8±4,7	0
0,05	0	6,1±5,0	5,9±4,9	0
До впливу антибіотика	9,0±7,9	9,0±7,9	9,0±7,9	9,0±7,9

Як видно з даних табл. 3.13, МБК антибіотиків, яка впливає на планктонні форми не знищує мікробні клітини у біоплівці. Відмічається поступове зростання кількості мікробних клітин у складі біоплівки по мірі зниження концентрації антибіотиків. Кількість клітин у біоплівці, сформованій *S. aureus* за найвищої дії МБК на планктонні культури тетрацикліну була, в середньому, в 250 тис. разів менша, порівняно з кількістю за найменшої концентрації цього антибіотика. Кількість *S. aureus* у біоплівці за найнижчої дії МБК виявилася тільки в 25 разів менша, порівняно з кількістю клітин у біоплівці в контролі. Це вказує, що існуючи у матриці біоплівки

золотистий стафілокок практично недоступний до дії антибіотиків, не дивлячись на високу чутливість планктонних клітин до цих антибіотиків.

МБК антибіотиків амоксициліну з клавулановою кислотою і енрофлоксацину значно сильніше діяла на клітини *S. aureus* у біоплівці, порівняно з тетрацикліном і гентаміцином. Після дії найвищої МБК (0,8 mg/mL) даних антибіотиків кількість клітин у біоплівці становила $1,8=1,3$ і $2,1\pm 1,5$ Ig КУО/см² змиву, відповідно. Також відмічаємо найменшу кількість клітин *S. aureus* у біоплівці після дії найнижчої МБК амоксициліну (5,9 Ig КУО/см²), порівняно до висиву антибіотиків.

Отже, підсумовуючи дослідження можна стверджувати, що виділені при субклінічних формах маститу корів бактерії мають здатність формувати біоплівку високої щільності, яка ускладнює ефективність протимікробної терапії хвороби та визначає хронічний характер її перебігу. Тому, з метою обґрунтування ефективності лікування маститу необхідно підбирати таку концентрацію протимікробних препаратів, яка ефективно діє на мікробні клітини, сформовані у біоплівки.

Матеріали даного підрозділу опубліковано в науковій праці:

Horiuk Y.V., Kukhtyn M.D., Strayskyyy Y.S., Havrylianchyk R.Y., Horiuk V.V., Fotina H.A. Comparison of the minimum bactericidal concentration of antibiotics on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*: mastitis causative agents. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2018. Vol. 9(6). P. 616–622. [170].

3.1.5. Аналіз метицилінрезистентності та біологічних властивостей стафілококів – господарів літичних бактеріофагів

Стійкість до антибіотиків нині є серйозною загрозою здоров'ю населення. Золотистий стафілокок, особливо стійкий до метициліну *S. aureus* (MRSA), також є одним із прикладів антибіотикорезистентного збудника, який циркулює у тваринництві і здатний передаватися людям. Даний патоген може

часто безсимптомно колонізувати тварин, проте в окремих випадках здатний викликати інфекції у людей і тварин, включаючи летальні випадки.

Встановлено, що до 60 % інфекцій, спричинених золотистим стафілококом, є стійкими до метициліну (MRSA) у Європі. В Америці цей показник досягав 80 %, в Африці 80 %, у регіоні Східного Середземномор'я понад 50 %, у деяких частинах регіону Південно-Східної Азії 25 % [376].

В Україні більшість дослідницьких робіт зосереджують свою увагу на дослідженні MRSA, виділених на молочних фермах [410]. На жаль, у багатьох дослідженнях резистентна до метициліну мікрофлора не ідентифікуються до видового рівня та/або досліджуваної генетичної основи їх стійкості. Видова ідентифікація стафілококів, у тому числі ізолятів, стійких до метициліну, на молочних фермах є потенційно важливою для встановлення формування джерела стійкої зоонозної інфекції та резервуарів генів протимікробної стійкості. Тому нами було вивчено поширення стафілококів, стійких до метициліну, на молочних фермах Західного регіону України.

Для того, щоб вивчити поширення стафілококів, стійких до метициліну на молочних фермах Західного регіону України, нами було досліджено їх видовий склад та частоту виділення окремих видів з різних ареалів існування (рис. 3.9, табл. 3.14).

Результати дослідження з визначення видової циркуляції стафілококів на молочних фермах Західного регіону України виявили, що основними представниками роду *Staphylococcus* були види *S. aureus* та *S. haemolyticus*, які виділялися у рівних кількостях (20,3 %) При цьому основними їх джерелами були слизові оболонки носової порожнини доярок (66,6 та 75 % відповідно). Дещо менша кількість даних видів стафілококів виділялася зі шкіри рук доярок – 58,3 та 66,6 %. Біотопом існування даних видів стафілококів також була шкіра вимені та слизові оболонки носа корів. При цьому їх виділяли, в середньому, в 1,4 раза менше, ніж зі шкіри рук та слизових оболонок носа доярок. Доїльне обладнання (до санобробки) можна вважати умовно чистим. Так, *S. aureus* виділений лише у 6,2, а *S. haemolyticus* у 9,4 % досліджених

змивів. Забруднені проби молока *S. aureus* виявляли у 28,6 % досліджених зразків. Велику кількість цих видів знайдено і у стічних водах ферми (58,8 – 64,7 %).

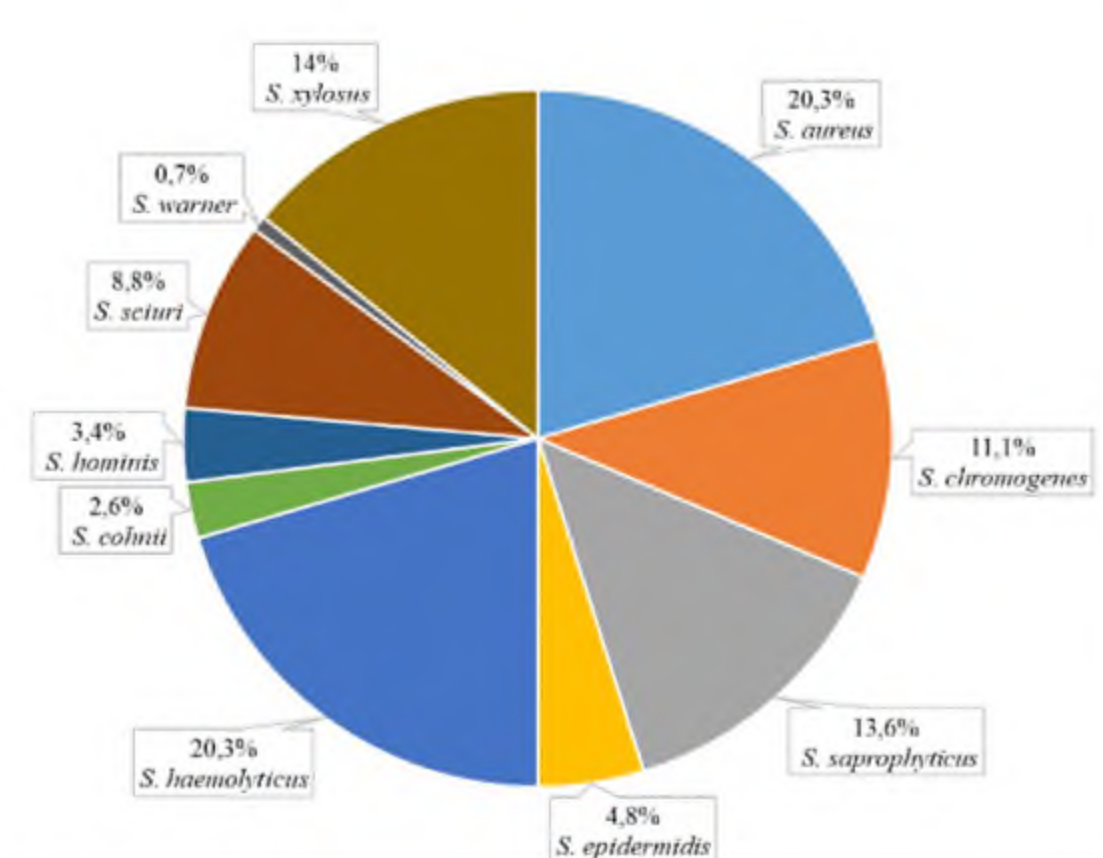


Рис. 3.9. Видовий склад стафілококів, що циркулюють на молочних фермах Західного регіону України.

Одним з видів стафілококів, які здатні спричиняти мастит корів, є *S. epidermidis*. Частка його виділення від корів була в середньому 12,7 %. При цьому даний вид контамінував руки доярок у 8,3 % випадків, а слизові оболонки носової порожнини у 3 рази частіше.

Велику кількість сапрофітного стафілококу виявлено на шкірі рук доярок – 75,0 % досліджених змивів були обсіяні цим видом, тоді, як на шкірі вимені та слизових оболонках носа корів їх було у 11,7 та 4,5 разів менше.

Ідентифікація ізольованих стафілококів, які циркулюють на молочних фермах Західного регіону України, %, n
=142

Вид стафілококів	Досліджено зразків													
	Шкіра вимені корів, n=31		Слизіві носа корів, n=24		Шкіра рук доярок, n=12		Слизіві носа доярок, n=12		Змиви з доїльного обладнання, n=32		Стічні води, n=17		Молоко сире, n=14	
	n ¹	%	n ¹	%	n ¹	%	n ¹	%	n ¹	%	n ¹	%	n ¹	%
<i>S. aureus</i>	13	41,9	14	58,3	7	58,3	8	66,6	2	6,2	11	64,7	4	28,6
<i>S. chromogenes</i>	12	38,7	9	37,5	0	0	3	25,0	0	0	6	54,5	1	7,1
<i>S. colomi</i>	1	3,2	2	8,3	1	8,3	1	8,3	0	0	2	11,7	0	0
<i>S. epidermidis</i>	4	12,9	3	12,5	1	8,3	3	25,0	1	3,1	1	9,1	1	7,1
<i>S. haemolyticus</i>	16	51,6	9	37,5	8	66,6	9	75,0	3	9,4	10	58,8	2	14,3
<i>S. hominis</i>	0	0	0	0	6	50,0	4	33,3	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	2	6,4	4	16,6	9	75,0	6	50,0	4	12,5	12	70,6	1	7,1
<i>S. sciuri</i>	9	29,0	6	25,0	0	0	0	0	0	0	9	52,9	0	0
<i>S. warner</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	11,7	0	0
<i>S. xylosus</i>	7	22,9	7	29,2	4	33,3	5	41,6	6	18,7	9	52,9	0	0

Примітки. n – кількість змивів, n¹ – кількість змивів, обсяжних окремими видами стафілококів.

S. chromogenes обселював вим'я та ніс корів у 37,5 – 38,7 %. При цьому взагалі не виділявся з шкіри рук доярок. Стічні води забруднював у 54,5 % проб.

Приблизно у рівних кількостях від корів виділяли *S. sciuri* та *S. xylosus* (22,9 – 29,2 %). При цьому *S. sciuri* не контамінував руки та слизові оболонки людей, тоді як *S. xylosus* виділявся у 33,3 – 41,6 % досліджених змивів.

Також нами були ідентифіковані такі види, як *S. cohnii* та *S. warner*. Незначна кількість *S. cohnii* (до 11,7 %) рівномірно обселювала всі досліджені зразки, окрім змивів з доїльного обладнання, тоді як *S. warner* виділявся лише зі стічних вод ферми (11,7 %).

Наступним етапом дослідження було визначити частоту виділення стафілококів різних видів, стійких до метициліну (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

**Частота виділення *Staphylococcus spp.*, стійких до метициліну,
%, n = 138**

Вид стафілококів	Досліджено культур всього		Кількість культур, стійких до метициліну	
	n	%	n ¹	%
<i>S. aureus</i>	56	100	15	26,8
<i>S. chromogenes</i>	22	100	1	4,5
<i>S. haemolyticus</i>	12	100	3	25
<i>S. xylosus</i>	12	100	2	16,6
<i>S. saprophyticus</i>	10	100	2	20
<i>S. epidermidis</i>	8	100	0	0
<i>S. cohnii</i>	6	100	0	0
<i>S. hominis</i>	6	100	2	33,3
<i>S. sciuri</i>	5	100	0	0
<i>S. warner</i>	1	100	0	0

Примітки: n – кількість досліджених культур; n¹ – кількість культур стафілококів стійких до метициліну.

З даних табл. 3.18 видно, що майже серед усіх ідентифікованих видів стафілококів виявлялися види стійкі до метициліну, тільки види *S. epidermidis* та *S. solnis* були у 100 % чутливими до даного антибіотику. Найбільша частка стійких культур була виявлена у виду *S. hominis* – 33,3 %. Тоді, як *S. aureus* проявляв стійкість у 1,2 рази меншу, порівняно з *S. hominis*. Схожі результати отримали при дослідженні культур *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* та *S. xylosus*, їх стійкість була у 1,3, 1,6 та 2,0 рази меншою, ніж *S. hominis*.

Результати дослідження антибіотикорезистентності стафілококів, стійких до метициліну, наведено в таблиці 3.16.

Таблиця 3.16

Резистентність стафілококів до деяких антибіотиків та метициліну

Виділена культура	Вид стафілококу	Джерело виділення	Антибіотикорезистентність ¹
Sam-1	<i>S. aureus</i>	Шкіра рук доярок	P, K, TE, CTR
Sam-2	<i>S. aureus</i>	Слизова оболонка носа доярок	P, K, EX, CTR
SAm-14	<i>S. aureus</i>	Шкіра вимені корови	P, K, TE
SAm-15	<i>S. aureus</i>	Слизова оболонка носа корови	P, TE, EX
Sch-1	<i>S. chromogenes</i>	Шкіра вимені корови	P, EX
Shaem-1	<i>S. haemolyticus</i>	Слизові оболонки носа доярок	P, K, CTR
Sx-1	<i>S. xylosus</i>	Стічні води	P, TE, CTR
Ss-2	<i>S. saprophyticus</i>	Стічні води	P, TE
Shom-1	<i>S. hominis</i>	Шкіра рук доярок	P, K, EX, CTR

Примітки ¹ визначено стійкість до P (бензилпеніцилін, 10 U), K (канаміцин, 30 µg), TE (тетрацилін, 30 µg), EX (енрофлоксацин, 10 µg), CTR (цефтріаксон, 30 µg); Sam-1, Sam-2, SAm-14, SAm-15, Sch-1, Shaem-1, Sx-1, Ss-2, Shom-1 - культури золотистих стафілококів, які зберігаються в робочих колекціях штамів

З даних табл. 3.16 видно, що всі культури, які проявляли стійкість до метициліну, були мультирезистентними. Так, 33,3 % досліджених культур, серед яких були види *S. aureus* та *S. hominis*, проявляли резистентність до

чотирьох з п'яти досліджених антибіотиків. Стійкими до трьох антибіотиків були 44,4 % культур, та до двох – 22,2 % відповідно.

Стійкість до β -лактамних антибіотиків є специфічною патогенною особливістю стафілококів [169, 410]. Наше дослідження виявило, що на молочних фермах західного регіону України циркулюють штами *S. aureus*, які проявляють стійкість до метициліну. При цьому вони були виділені з різних джерел в межах території молочних ферм. Іншими видами стафілококів, які були стійкими до метициліну виявилися *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, та *S. chromogenes*. Крім того, виявлені стафілококи, стійкі до метициліну, були резистентними щонайменше до двох інших антибіотиків.

Отже, можна зробити висновок, що різні види стафілококів, які циркулюють на молочних фермах, являють собою великий резервуар генів резистентності до антимікробних препаратів, які в процесі одержання молока можуть його забруднювати та передаватися людям. Тому необхідно встановити постійний контроль за виділенням не лише MRSA, але і інших стафілококів, стійких до β -лактамних антибіотиків.

Коагулазопозитивні стафілококи є опортуністичним умовно-патогенними мікроорганізмами і при виділенні коагулазопозитивних стафілококів зазвичай вважають, що це золотистий стафілокок [301]. Цим патогенам властиво ряд регуляторних механізмів контролю синтезу його численних факторів патогенності у відповідь на зовнішні подразники. До них відносять токсиноутворення, коагуляцію плазми, утворення гемолізинів, лецитиназну активність, утворення ДНК-ази, фосфатази, ліпази тощо. Ці патогенні властивості забезпечують виживання бактерій у середовищі молочної залози, захищають стафілококи від впливу імунної системи тварини, сприяють розвитку запальних процесів та колонізації збудників [242]. Отже, для того, щоб визначити участь даних мікроорганізму у етіології та патогенезі розвитку маститу, необхідно визначити його патогенні властивості.

В табл. 3.17 наведено основні патогенні характеристики *S. aureus*, що циркулює на молочних фермах західного регіону України.

Патогенні властивості коагулазопозитивних стафілококів, виділених з різних біотопів молочних ферм, %

Біотоп, з якого виділено <i>S. aureus</i>	К-ть культур, n (%)	Патогенні властивості			
		Коагулаза, n (%)	Гемоліз, n (%)	Лецитиназа, n (%)	ДНК-аза, n (%)
Шкіра дійок здорових корів	52 (100)	52 (100)	51 (98,0)	44 (84,6)	40 (76,9)
Доїльне обладнання	65 (100)	65 (100)	59 (90,7)	42 (64,6)	48 (73,8)
Молоко свіжонадоєне від здорових корів	49 (100)	49 (100)	38 (77,5)	31 (63,3)	36 (73,5)
Секрет вимені хворих корів	254 (100)	254 (100)	254 (100)	251 (98,8)	246 (96,8)
Шкіра дійок корів, хворих на мастит	89 (100)	89 (100)	85 (95,5)	86 (96,6)	83 (93,2)

Як видно з даних табл. 3.17, що серед коагулазопозитивних стафілококів найбільш патогенними властивостями володіють бактерії, що були виділені від корів хворих на мастит. Зокрема, практично в 100 % випадків вони продукували такі токсини, як гемолізини, лецитиназу та ДНК-азу. Не нижче 95 % за проявом токсигенних властивостей були стафілококи виділені із шкіри дійок хворих маститом, що вказує на обсіменіння даного біотопу із секрету вимені. Коагулазопозитивні стафілококи виділені з молочної залози від здорових корів та доїльного обладнання в значно меншій кількості продукували такі токсини патогенності, як лецитиназу та ДНК-азу – в 63,3 – 84,6 % випадків.

Таким чином, дані вказують, що стафілококи, які виділені з молочної залози хворих на мастит корів вважаються більш патогенними і вірулентними.

Відомо, однією з основних ознак патогенності є здатність *S. aureus* продукувати ентеротоксини [110]. В табл. 3.18 наведено результати досліджень з визначення частоти виділення золотистих стафілококів з ентеротоксигенними властивостями з різних біотопів молочних ферм.

Таблиця 3.18

Частота виділення ентеротоксигенних *S. aureus*, виділених з різних біотопів молочних ферм, %, n =83

Біотоп з якого виділено <i>S. aureus</i>	Кількість досліджених культур		Кількість культур з ентеротоксигенними властивостями	
	n	%	n	%
Шкіра дійок здорових корів	11	100	2	18,2±1,6
Шкіра дійок корів, хворих на мастит	24	100	8	33,3±2,6
Молоко свіжонадоєне від здорових корів	12	100	0	0
Секрет вимені хворих корів	24	100	17	70,8±6,3
Доїльне обладнання	12	100	0	0

З даних, представлених в табл. 3.18 видно, що основним біотопом існування золотистого стафілококу, який проявляє ентеротоксигенні властивості є секрет вимені корів, хворих на мастит, 70.8±6,3 % штамів досліджених культур продукували ентеротоксини різних типів. В той час, шкіра дійок вимені хворих корів була обсіяна у 2,1 рази ($p < 0,05$) менше, ніж їх секрет. Цікавим фактом є те, що ентеротоксигенні штами були виділені з шкіри дійок здорових корів, хоча і в незначних кількостях (18,2±1,6 %). При цьому ми не виявили ентеротоксичність у культур, які контамінували молоко свіжонадоєне від здорових корів та доїльне обладнання.

У табл. 3.19 наведено результати дослідження з визначення типів токсинів, які продукували штами золотистих стафілококів. Культури тестували з використанням тест-системи *RIDASCREEN SET A, B, C, D, E* («R-

Biorpharm AG, Дармштадт, Німеччина). Дослідження проведено в трьох повторях.

Таблиця 3.19

Типи ентеротоксинів, які продукували *S. aureus*, %, n = 27

Біотоп, з якого виділено <i>S. aureus</i>	Кількість культур, які продукували ентеротоксини:				
	SEA	SEB	SEC	SED	SEC/D
Шкіра дійок здорових корів, n 2	0	0	50	50	0
Шкіра дійок корів, хворих на мастит, n 8	0	0	25	37,5	37,5
Секрет вимені хворих корів, n 17	0	0	5,8	70,6	23,5

Примітки: *SEA* – ентеротоксини типу *A*, *SEB* – ентеротоксини типу *B*, *SEC* – ентеротоксини типу *C*, *SED* – ентеротоксини типу *D*, *SEC/D* – ентеротоксини типу *C* і *D*

Як видно з даних табл. 3.19, стафілококи, виділені з секрету корів, хворих на мастит, продукували ентеротоксини типу *D* (70,6 %), здатність продукувати токсини типу *C* була виявлена лише у 1 культури (5,8 %) та змішаний тип ентеротоксигенності (*SEC/D*) виявлено у 4 птамів (23,5). Також встановлено, що шкіра дійок корів, хворих на мастит, обсіяна стафілококами, які утворювали токсини *SED* та *SEC/D* у рівних кількостях – 37,5 %, дещо менша кількість культур продукувала токсини типу *SEC* (у 1,5 раза). Дві культури, які виділені зі шкіри вимені здорових корів, проявляли токсигенність з продукуванням типів токсинів *C* та *D* у рівних кількостях. Токсини типів *SEA* та *SEB* культури, виділені з різних біотопів молочних ферм, не продукували. Відомо, що культури стафілококів біотипу великої рогатої худоби продукують, в основному, токсини типів *C*, *D* і *C/D*, що свідчить про прояви клінічних і субклінічних форм маститів [122].

Отже, отримані результати дослідження підтверджують важливу роль ентеротоксигенних штамів золотистого стафілококу у патогенезі маститу та вказують на те, що здорові тварини також можуть бути резервуаром стафілококів з патогенними властивостями.

Підсумовуючи результати досліджень з поширення основних збудників маститу на молочних фермах Західного регіону України можна зробити висновки, що своєчасне виявлення та розуміння етіологічного чинника є важливим для ефективної профілактики та контролю даного захворювання. Результати наших досліджень показали, що найчастіше спричинюють мастит у корів *S. aureus* та *S. agalactiae*. При цьому штами *S. aureus*, які циркулюють на фермах, здатні утворювати щільні біоплівки, що значно ускладнює лікування корів за стафілококового маститу. Широке неконтрольоване застосування антибіотиків у ветеринарній медицині значно збільшує ризик розвитку антибіотикорезистентності патогенів. Крім того, насторожує те, що штами цього патогену володіють підвищеною стійкістю до протимікробних засобів, які нині використовуються у ветеринарній медицині. Також різні види стафілококів, які циркулюють на молочних фермах, являють собою великий резервуар генів резистентності до антимікробних препаратів, які в процесі одержання молока можуть його забруднювати та передаватися людям через харчовий ланцюг. Ці факти підкреслюють необхідність пошуку, розробки та впровадження нових альтернативних антибіотикам засобів боротьби з маститами у корів, особливо стафілококової етіології.

Матеріали даного підрозділу опубліковано в науковій праці:

Horiuk Y., Kukhtyn M., Salata V., Horiuk V. Species composition and methicillin resistance of staphylococci taken on dairy farms. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 2020. Vol. 22(97). P. 13–19. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9703> [498].

3.2. Обґрунтування вибору діючої речовини для створення препарату на основі бактеріофагів

Розвиток стійкості до антибіотиків у бактеріальних патогенів посилила необхідність впровадження нових ефективних заходів для боротьби з ними. Крім того, сільськогосподарські виробники зацікавлені в появі нових засобів і методів профілактики та лікування маститів без застосування антибіотиків. Це дозволить отримувати, так звану, органічну продукцію. Багато альтернативних методів, які використовуються для лікування маститів, мають певну теоретичну основу для розгляду їх ефективності [46, 107, 248]. Однак, незважаючи на те, що міжнародні організації пропагують фітотерапію та гомеопатію як альтернативу хімічним речовинам, результати їх ефективності на рівні ферм досить суперечливі. Альтернативними засобами у боротьбі з бактеріальною інфекцією можуть бути використані препарати бактеріофагів [101]. У даному підрозділі ми наводимо результати досліджень літичної активності бактеріофагових препаратів промислового виробництва щодо культу золотистих стафілококів різних біотипів, основні методи виділення бактеріофагів на молочних фермах та їх літичні властивості. В результаті проведених дослідів виділено та досліджено 196 культур золотистого стафілококу різного біологічного походження та 17 штамів бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах.

3.2.1. Вплив препаратів бактеріофагів на культури золотистого стафілококу різного біологічного походження

Бактерії *Staphylococcus aureus* володіють великою універсальністю в своїй здатності колонізувати різних господарів і викликати інфекції в різних анатомічних ділянках. Молекулярні процеси, відповідальні за захворюваність і специфічність господаря, вивчені недостатньо [333]. Вважається, що вони частково викликані відмінностями у змісті генів і алельними варіаціями між штамми. Певні виділяють декілька біотипів (ековарів) *S. aureus* залежно від їх біологічного походження, основні з яких *S. aureus var. hominis*, *S. aureus var.*

avium, *S. aureus* var. *canis*, *S. aureus* var. *bovis* [147]. Крім того, секвенування генома у людини і тварин виявило помітні відмінності, що забезпечує основу для ідентифікації специфічних генів, в тому числі відповідальних за антибіотико- та фагочутливість [208]. Попередні дослідження з вивчення літичної активності стафілококових бактеріофагів фокусувалися на визначенні чутливості *S. aureus*, виділених від хворих, із різного клінічного матеріалу та клінічно здорових людей. Проте відсутня інформація наскільки рефрактерними є вже описані препарати проти ековарів *S. aureus*, виділених від тварин. Тому приступаючи до розробки бактеріофагового препарату активного щодо *S. aureus* var. *bovis* збудника маститу корів нами було вивчено літичну активність препаратів бактеріофагів промислового виробництва, які присутні на ринку України щодо стафілококів різного біологічного походження.

У табл. 3.20 наведено результати дослідження впливу бактеріофагових препаратів з вмістом стафілококових фагів (Стафілококовий бактеріофаг® та Інтестіфаг®) на культури *S. aureus*, які були виділені з різних біотопів.

Таблиця 3.20

Чутливість *S. aureus* різного біологічного походження до бактеріофагових препаратів, %, n =198

Походження штамів	Кількість культур, n	Досліджені препарати	
		Стафілококовий бактеріофаг®	Інтестіфаг®
Культури, виділені з секрету молочної залози корів з ознаками маститу	96	0	0
Культури, виділені з молочних продуктів, які реалізуються на агропродовольчих ринках	26	0	0

Культури, виділені з біотопів людини з різними запальними процесами	74	25,6±2,5	91,8±8,2
Музейні штами: <i>S. aureus</i> №209-P, <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	2	0	100

З даних табл. 3.20 видно, що найбільш активним відносно виділених стафілококів та музейних штамів виявився препарат Інтестіфаг®. Він лізував культури, які виділені з біотопів людини та музейні штами *S. aureus* №209-P і *S. aureus* (ATCC 25923) у 91,8 – 100 % випадків. Препарат Стафілококовий бактеріофаг® знищував лише 25,6 % культур золотистих стафілококів, виділених від людей, що в 3,6 раза ($p < 0,05$) менше, ніж Інтестіфаг®. Крім того, Стафілококовий бактеріофаг® не впливав на ріст музейних штамів. Необхідно відмітити, що обидва препарати промислового виробництва не лізували культури, виділені з секрету молочної залози корів та культури, виділені з молочних продуктів, які реалізуються на агропродовольчих ринках.

Враховуючи досить низьку літичну активність препарату Стафілококовий бактеріофаг®, який є досить специфічним для стафілококів, нами додатково було проведено дослід з визначення його літичної активності щодо ізолятів *S. aureus*, які виділені та ідентифіковані від різних тварин та людини та зберігалися в нашій робочій колекції мікроорганізмів (табл. 3.21).

З даних табл. 3.21 видно, що фармакологічно-літична дія стафілококового бактеріофагу найбільш активна відносно *S. aureus* var. *hominis*. Із досліджених культур *S. aureus* var. *hominis* повний лізис по ходу стікання краплі виявили тільки у 4,8 %, а у 42,8 % культур проявився напівзливний лізис у три хрести. 14,3 % культур *S. aureus* var. *hominis* піддавалися слабкій літичній активності бактеріофагу, так як на місці нанесення краплі препарату відмічали не більше 10 фагових колоній. Також

виявлено 4,8 % культур даного біотипу, які були стійкими до стафілококового бактеріофагу.

Таблиця 3.21

**Спектр літичної активності препарату Стафілококовий бактеріофаг®
щодо різних біотипів *S. aureus*, %, n =76**

Активність	Біотипи <i>S. aureus</i>							
	<i>hominis</i>		<i>bovis</i>		<i>canis</i>		<i>avium</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
«1·1·1»	1	4,8	0	0	0	0	0	0
«+--+»	9	42,8	0	0	0	0	0	0
«+-»	5	23,8	0	0	0	0	0	0
«+»	2	9,5	0	0	0	0	0	0
«+/-»	3	14,3	1	2,8	0	0	0	0
« »	1	4,8	35	97,2	12	100	7	100
Всього культур	21	100	36	100	12	100	7	100

Примітки. «++++» – зливний (повний) лізис (відсутність росту культури), «---» – напівзливний лізис, ріст культури в зоні лізису (наявність росту декількох колоній); «·1» – наявність в місці нанесення краплі фага понад 50 колоній фага (плям лізису); «· » – наявність в місці нанесення краплі фага від 20 до 50 колоній фага; «+/-» – наявність в місці нанесення краплі фага менше 20 колоній фага; – повна відсутність лізису

При дослідженні літичної активності стафілококового бактеріофагу до 35 культур *S. aureus var. bovis*, встановлено прояв літичної дії тільки до однієї культури. При цьому ступінь лізису оцінювався в «+/-», тобто виявляли менше 20 фагових колоній. Водночас досліджуваний нами стафілококовий бактеріофаг не проявляв літичну дію на культури *S. aureus var. avium* і *S. aureus var. canis*. Отже, проведені дослідження вказують, що фармакологічно-літична активність препарату Бактеріофаг стафілококовий® спрямована, в основному, на *S. aureus var. hominis*, а на інші біотипи практично не діє. Це дає підставу вважати, що для боротьби зі стафілококовими інфекціями у тварин застосування стафілококового бактеріофагу, який виготовлений з культур *S.*

aureus var. hominis є недоцільним. Для цього необхідно сконструювати стафілококові бактеріофаги, виділені від конкретного виду тварин, тобто враховувати їх специфічність щодо господаря-носія стафілококу.

На рисунку 3.10 наведено фото фагочутливості людського біотипу та великої рогатої худоби до препарату Бактеріофаг стафілококовий®.

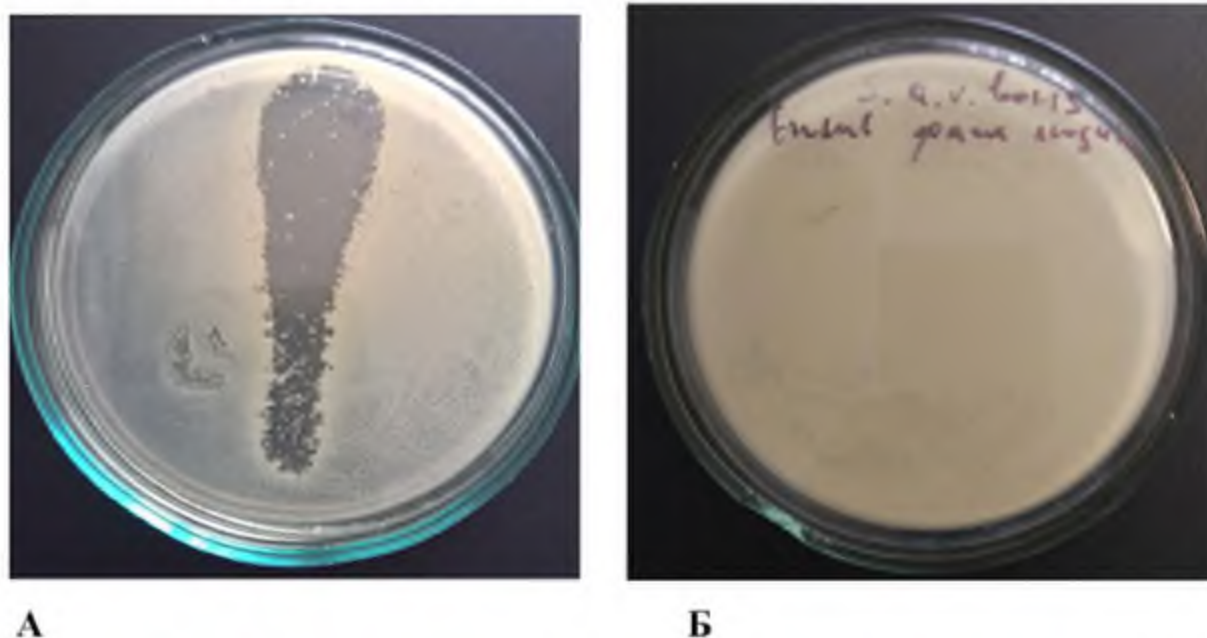


Рис. 3.10. Дослідження фагочутливості різних біотипів *S. aureus* до препарату Бактеріофаг стафілококовий® по методу Отто: А – *S. aureus var. hominis* - напівзливний лізис; Б – *S. aureus var. bovis* – повна відсутність лізису.

З даних рисунку 3.10 видно чітку зону лізису мікробних клітин під впливом фагу (А) та відсутність лізису, що вказує на неактивність фагу до даної культури (Б).

Отже, нами виявлено, що препарати на основі бактеріофагів промислового виробництва неефективні щодо культур золотистих стафілококів, виділених з молочних продуктів та від корів, хворих маститом. Це свідчить про те, що коло господарів штамів бактеріофагів, використаних при виробництві препаратів, не включає штамів *S. aureus var. bovis*. Тому для лікування маститу у корів, спричиненого *S. aureus var. bovis*, необхідно виділяти та досліджувати нові штамів специфічних бактеріофагів.

Результати роботи, які описані в даному підрозділі висвітлено в науковій праці:

Horiuk Y. Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 2019. Vol. 21 (94). P. 115–120. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9421> [278].

3.2.2. Передумови та підбір методики для створення протимаститного препарату специфічного щодо *Staphylococcus aureus variant bovis*

Вузька специфічність фагів вказує на необхідність постійного пошуку нових ізолятів для використання їх з терапевтичною метою [89, 557]. Зазвичай здатність продукувати високий титр фагових запасів значною мірою залежить від конкретного фага і клітини-господаря [458].

За результатами досліджень, які описані в розділі 3.1 нами було обрано штам золотистого стафілококу, який є типовим збудником маститу у корів.

Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f - штам мікроорганізмів родини *Staphylococcaceae*; рід: *Staphylococcus*; вид: *Staphylococcus aureus*; біотип: *Staphylococcus aureus var. bovis*. Йому притаманні наступні ознаки:

Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f виділено із зразка секрету молочної залози ВРХ, хворої субклінічною формою маститу;

– культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості: культури *Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f* факультативні анаероби, на середовищі м'ясо-пептонний агар з 6,5 % NaCl утворюють круглі, рівні колонії кремового кольору; на кров'яному агарі утворюють колонії з зоною β -гемолізу; на середовищі з кристалічним фіолетовим утворюють колонії кремового кольору; на середовищі Байд-Найкера чорні випуклі круглі з рівними краями колонії з перламутровим вінчиком. Клітини через 24 години росту на МПА - коки, діаметром 0,5-1,5 мкм, розташовані одиночно, парами або у вигляді грона винограду. Нерухомі, грампозитивні, не утворюють спор

та капсул. Фізіолого-біохімічні особливості штаму: каталазопозитивні, ферментують глюкозу, окиснюють мальтозу, трехалозу, галактозу, продукують коагулазу, фосфатазу, лецитиназу:

- володіє ентеротоксигенними (продукує ентеротоксин типу D) та біоплівкоутворюючими (утворює щільні біоплівки) властивостями;
- проявляє стійкість до більше як трьох антибіотиків.

Крім того, для використання штаму *Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f* в якості маточної культури його було протестовано на наявність профагів за допомогою фізичних та хімічних методів. Застосування фізичних методів індукції профагу в бактеріальній клітині передбачало застосування ультрафіолетового опромінення з довжиною хвилі 250 нм. Для цього ми попередньо наносили на чашки Петрі з живильним середовищем 0,5 мл добової культури *Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f*, залишали на 10 хвилин для підсихання та впливали УФО протягом 5 хвилин на відстані 1 м. Далі чашки інкубували протягом 24 год за температури 37 °С. Результати враховували за наявністю плям лізису на чашці Петрі.

Мітоміцин С є природнім лікувальним засобом, крім того він часто використовується як речовина для індукції розвитку профагу в бактеріальній клітині [471]. Для обраного нами штаму ми використовували його в дозі 1,0 - 2,0 мкг/см³. Для проведення дослідів з мітоміцином С попередньо ми нарощували досліджувану культуру для отримання суспензії з оптичною 0,1 – 0,2 од. Потім цю суспензію розливали у дві пробірки: дослідну та контрольну. До дослідної пробірки додавали 2,0 мкг/см³ Мітоміцину С. Потім пробірки інкубували в термостаті за температури 37 °С, щогодини перевіряючи зміну оптичної густини. Лізогенною культуру вважали при значному зменшенні оптичної густини дослідної пробірки порівняно з контролем. Додатково проводили посів суспензії з дослідної пробірки методом двошарового агару та реєстрували наявність чи відсутність негативних колоній фагу.

В табл. 3.22 наведено результати дослідження лізогенних властивостей обраного нами штаму в якості маточного для нарощування титрів бактеріофагів.

Таблиця 3.22

Лізогенні властивості *Staphylococcus aureus* var. *bovis* 1491 f

Чинники, які сприяють лізогенії	Досліджувана культура <i>Staphylococcus aureus</i> var. <i>bovis</i> 1491 f	
	Контроль	Дослід
Вплив УФО	-	-
Вплив Мітоміцину С	-	-

Примітки: «-» не виявлено плям лізису та негативних колоній бактеріофагів

З даних табл. 3.22 видно, що штаму *Staphylococcus aureus* var. *bovis* 1491 f може бути використаний в якості маточної культури для нарощування титрів бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах, оскільки вплив фізичних та хімічних факторів не спричинив індукцію профагу в бактеріальній клітині.

Штам *Staphylococcus aureus* var. *bovis* 1491 f первинно задепонований в колекції мікроорганізмів Національного центру штампів мікроорганізмів України під номером 736 (Свідоцтво на штам від 05.03.2019 року) (Долаток А) і на території України даного штаму мікроорганізмів до сьогодні ідентифіковано не було. Даний штам був використаний нами для нарощування титру типових бактеріофагів для подальшого розроблення фагового препарату.

Існують традиційні методики, що використовуються для нарощення та очищення фагів. Вони включають центрифугування, фільтрацію, ультрафільтрацію, осадження поліетиленгліколем тощо [87, 465]. Багато з перерахованих методів не мають спільного характеру, є трудомісткими і здатні впливати на відновлення фагів і/або їх життєздатність. Основною вимогою до перерахованих методів є те щоб, фаголізат не містив бактерій, грибів та залишків культурального середовища [98]. Тому нами було проаналізовано основні методики для виділення фагів, специфічних щодо *S. aureus* var. *bovis*

з секрету корів, хворих субклінічною формою маститу, які можуть бути використані для створення фагового препарату для профілактики і лікування маститу.

При посіві суспензії даних мікроорганізмів на двошаровому МПА, приготованому за методом Грація, бактеріофаг сформував каламутні округлі, з нерівними краями негативні колонії (рис. 3.11 А).

Мікроскопія бляшок показала слабо виражений ріст сторонньої мікрофлори. Послідовний пересів негативних колоній фагу призвів до того, що *S. aureus var. bovis* були продуцентами фагу, який формувал поодинокі колонії з прозорими центрами (рис. 3.11 Б).

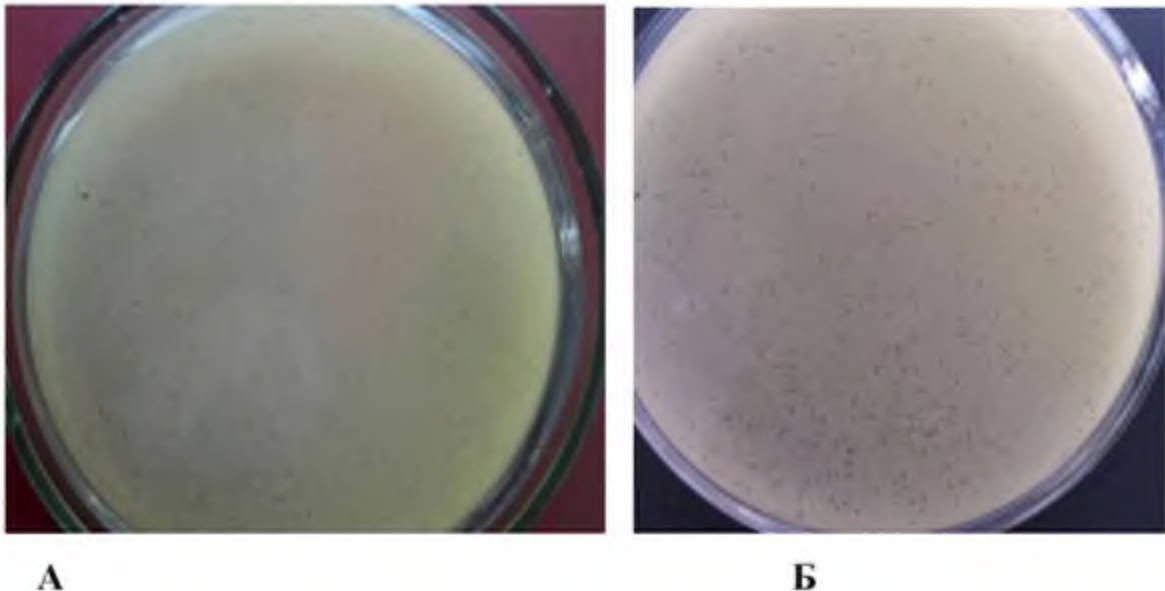


Рис. 3.11. Лізис індикаторної культури *S. aureus var. bovis* на двошаровому МПА, за методом Грація: А – морфологія негативних колоній з ознаками вторинного зростання індикаторної культури; Б – морфологія негативних колоній «чистої» лінії фага.

Результати дослідження з порівняння методів очищення фаголізу від сторонньої мікрофлори наведено в табл. 3.23.

З табл. 3.23 видно, що після першого пасажування фагів виділялася залишкова мікрофлора, яка була представлена різними видами. При обробці зразків трихлорметаном після першого пасажування виділяли лише *S. aureus*.

При наступних пасажах жодних бактерій виділено не було. Температурна обробка при 60 ± 2 °C протягом 30 хвилин не діяла на термостійкі бактерії (*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*). При другому пасажі виділяли рід *Enterococcus*. В подальшому стороння мікрофлора не виділялася. Ефективним методом очищення фаголізату від сторонньої мікрофлори виявилось фільтрування – виділяли рід *Klebsiella* при перших двох пасажах. Крім того, витрати часу на застосування даного методу в 3 рази менші в порівнянні з іншими методами, взятими в дослід.

Таблиця 3.23

Ефективність методів очищення фаголізату від сторонньої мікрофлори,

$\bar{x}\pm SE, n = 9$

Методи очищення	Вид мікрофлори	Витрати часу, хв.
Перший пасаж		
Фільтрування	<i>Klebsiella</i>	10±2
Температура	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Bacillus</i>	30±5
Трихлорметан	<i>S. aureus</i>	30±5
Другий пасаж		
Фільтрування	<i>Klebsiella</i>	10±2
Температура	<i>Enterococcus</i>	30±5
Трихлорметан	-	30±5
Третій пасаж		
Фільтрування	-	10±2
Температура	-	30±5
Трихлорметан	-	30±5

Отже, результати проведених досліджень щодо очищення стафілококових бактеріофагів від бактеріальних клітин вказують на ефективність застосування багатоступеневої фільтрації. Даний метод є оптимальним за рахунок скорочення витрат часу на проведення досліджень,

порівняно з температурною обробкою та є безпечним для організму людини, порівняно з впливом хлороформу.

Результати роботи, які описані в даному підрозділі висвітлено в науковій праці:

Horiuk Y.V. Isolation of bacteriophages specific for *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 2019. Vol. 7(3). P. 143–146. Doi: <https://doi.org/10.32819/2019.71025> [277].

3.2.3. Виділення бактеріофагів та вплив на їх фармакологічну активність фізико-хімічних чинників при створенні препарату

Деякі дослідники описують виділення та характеристику бактеріофагів, специфічно активних проти *S. aureus*, які є збудниками маститу корів на молочних фермах [211, 229]. Однак відсутня інформація про бактеріофаги, які циркулюють безпосередньо на молочних фермах в Україні, оскільки вони можуть бути використані для створення препаратів, ефективних при лікуванні маститу, спричиненого золотистим стафілококом.

Нами проведено мікробіологічну характеристику стафілококових фагів, виділених на молочних фермах України для створення препаратів для лікування маститів корів. Матеріалом для дослідження служили зразки секрету молочної залози корів з ознаками маститу та стічні води.

Для визначення спектру літичної активності виділених бактеріофагів, активних щодо *S. aureus* var. *bovis* створена робоча колекція мікроорганізмів з польових штамів, які циркулюють на молочних фермах Західного регіону України. Проводили його шляхом нанесення фага на газон бактеріальної культури. Всього нами було протестовано 46 штамів бактерій *S. aureus*, які є збудниками маститу корів.

В табл. 3.24 наведено спектр літичної активності виділених бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах та лізують більше 10 % культур виділених стафілококів. Даним штамам присвоєно назви.

Спектр літичної активності бактеріофагів на молочних фермах, %

Штам бактеріофагу	Походження штаму	Кількість культур <i>S. aureus</i> , які чутливі до впливу фагу	
		n	%
<i>Phage SAвB01</i>	стічні води	16	16,6
<i>Phage SAвB02</i>	стічні води	35	36,4
<i>Phage SAвB03</i>	стічні води	41	42,7
<i>Phage SAвB04</i>	стічні води	29	30,2
<i>Phage SAвB05</i>	шкіра дійок здорових корів	42	43,7
<i>Phage SAвB06</i>	шкіра дійок здорових корів	33	34,4
<i>Phage SAвB07</i>	секрет молочної залози хворих корів	52	54,2
<i>Phage SAвB08</i>	секрет молочної залози хворих корів	69	71,8
<i>Phage SAвB09</i>	секрет молочної залози хворих корів	42	43,7
<i>Phage SAвB10</i>	секрет молочної залози хворих корів	49	51,0
<i>Phage SAвB11</i>	секрет молочної залози хворих корів	14	14,9
<i>Phage SAвB12</i>	секрет молочної залози хворих корів	72	75,0
<i>Phage SAвB13</i>	секрет молочної залози хворих корів	7	7,3
<i>Phage SAвB14</i>	секрет молочної залози хворих корів	89	92,7
<i>Phage SAвB15</i>	шкіра вимені хворих корів	25	26,0
<i>Phage SAвB16</i>	шкіра вимені хворих корів	32	33,3
<i>Phage SAвB17</i>	шкіра вимені хворих корів	28	29,2

З даних, представлених в табл. 3.24 видно, що найбільш широким спектром літичної активності володіли штами бактеріофагів, які були виділені з секрету молочної залози корів, хворих на мастит. Так, штами *Phage SAvB07*, *Phage SAvB08*, *Phage SAvB12* та *Phage SAvB14* знищували культури золотистих стафілококів у 54,2 – 92,7 % випадків. Інші досліджені бактеріофаги були менш активними щодо культур *S. aureus*. Тому для подальших досліджень нами обрано бактеріофаги *Phage SAvB07*, *Phage SAvB08*, *Phage SAvB12* та *Phage SAvB14*.

Так, нами було більш детально проаналізовано характеристики штамів бактеріофагів, які проявляли найбільш широкий спектр літичної дії. В табл. 3.25 наведено характеристику негативних колоній виділених фагів.

Таблиця 3.25

Характеристика негативних колоній виділених фагів

Досліджені фаги	Діаметр негативних колоній, мм	Форма негативних колоній	Ступінь прозорості	Характер країв колоній
<i>Phage SAvB07</i>	1,0+0,1	кругла	напівпрозора	рівний
<i>Phage SAvB08</i>	1,5+ 0,1	кругла	напівпрозора	рівний
<i>Phage SAvB12</i>	2,0± 0,1	кругла	напівпрозора	рівний
<i>Phage SAvB14</i>	1,5± 0,1	кругла	прозора	рівний

При оцінці форми колоній виділених фагів та характеристик їх країв різниці не виявлено – у всіх фагів форма колоній кругла, а краї рівні. За ступенем прозорості виділені фаги утворювали напівпрозорі зони, за винятком фага *SAvB14*, у якого зона була прозора. Діаметр колоній фагів становив від

1,0 до 2,0 мм, найменші колонії були у фага *SAvB07* $1,0 \pm 0,1$ мм, а найбільший діаметр у фага *SAvB12* $2,0 \pm 0,1$ мм. Фаг, який утворював прозору колонію (*SAvB14*) мав діаметр $1,5 \pm 0,1$ мм.

Штами бактеріофагів з коротким латентним періодом та з великою кількістю віріонів після руйнування бактеріальної клітини вважаються ідеальними для створення терапевтичних засобів.

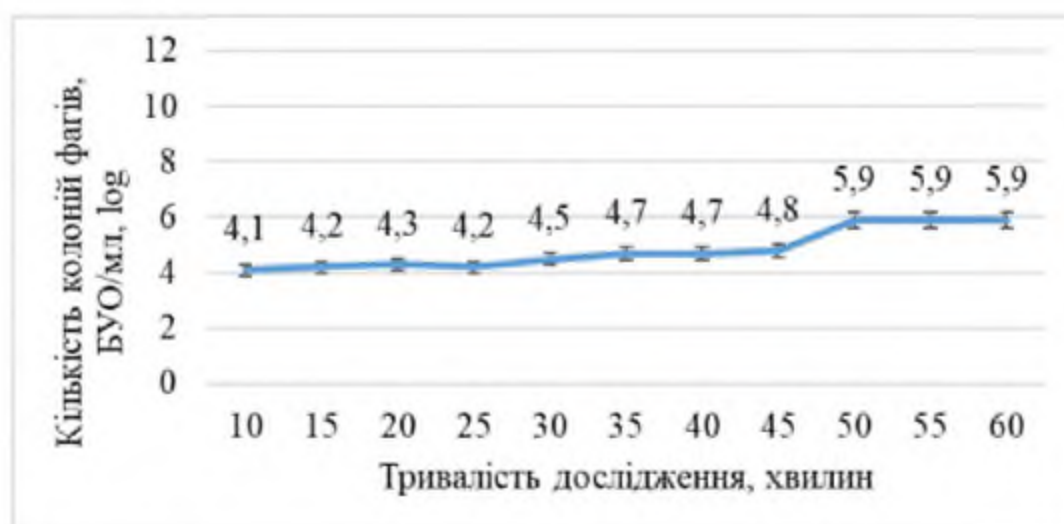
На рис. 3.12 наведено криві росту виділених бактеріофагів.



А – Phage *SAvB07*



Б – Phage *SAvB08*



В – Phage SAвB12



Г – Phage SAвB14

Рис 3.12. Крива росту бактеріофагів, кожна точка даних – це середнє значення± стандартні відхилення від трьох незалежних експериментів.

Видно, що у фагів *SAвB07* і *SAвB08* (рис. 3.12 А, Б) латентний період, за якого відбулося руйнування мікробних клітин, становив 35-40 хв. За цей період часу кількість активних фагів збільшилася, в середньому на два порядки до 6 lg БУО/мл. У фага *SAвB12* (рис. 3.12 В) латентний період часу збільшився в 1,7 раза ($p < 0,05$) порівняно з фагами *SAвB07* і *SAвB07* і становив 60 хв. При цьому кількість віріонів також зростала на два порядки. Фаг *SAвB14* також мав короткий латентний період дії у 35 хв, проте він спричиняв вивільнення великої кількості віріонів, яка становила 12 lg БУО/мл. Це дає

підставу вважати, що відбувається інфікування і руйнування великої кількості клітин стафілококів. Якщо порівнювати криві росту виділених фагів, то бактеріофаги *SAvB07*, *SAvB08* і *SAvB12* можна віднести до помірних, оскільки проходив лізис окремих мікробних клітин стафілококів та вивільнення незначної кількості віріонів. Водночас, фаг *SAvB14* мав короткий латентний період та на 6 порядків більше спричиняв вивільнення віріонів, ніж фаги *SAvB07*, *SAvB08* і *SAvB12*.

Отже, результати досліджень показують, що штам бактеріофагу *SAvB14* здатний лізувати культури *S. aureus var. bovis* з утворенням чітких прозорих колоній, характерних для стафілококових бактеріофагів. Крім того, серед досліджених штамів даний фаг мав короткий латентний період з вивільненням великої кількості віріонів. Такі характеристики роблять його хорошим кандидатом для створення препарату на основі бактеріофагів для лікування корів за маститу.

Практика фаготерапії заснована на виділенні фагів з природнього навколишнього середовища. Як правило, фаг який виділяють, піддають скринінгу щодо літичної активності проти патогенних бактеріальних штамів (для виявлення діапазонів господарів), а потім оцінюють з використанням моделей *in vitro* та *in vivo* [160].

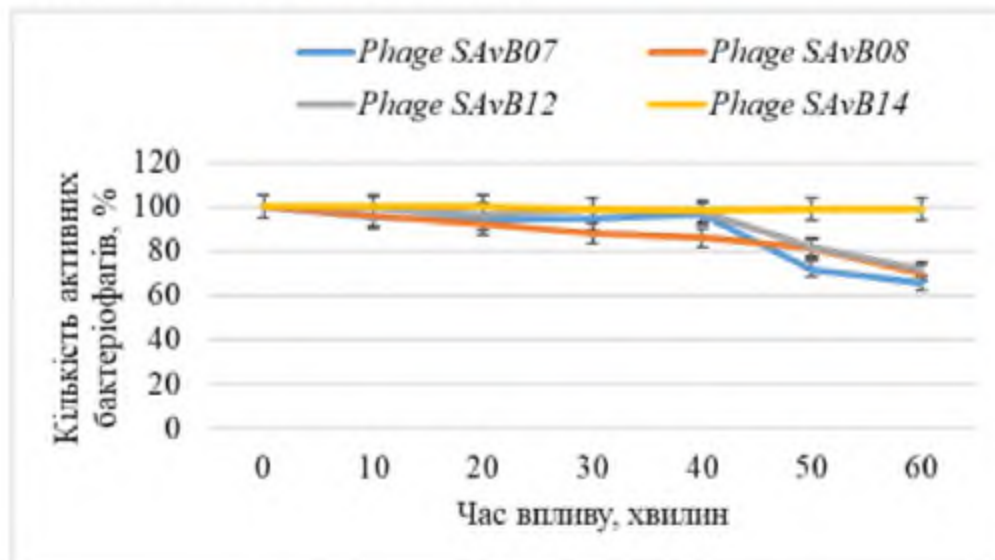
Крім характеристики, заснованої на біологічних властивостях, фаги повинні бути досліджені на стійкість до впливу різних умов зовнішнього середовища, щоб підтвердити їхній потенціал при виготовленні біопрепаратів. Дослідниками встановлено, що бактеріофаг по відношенню до однієї і тієї ж культури, але при різних умовах може проявляти різну літичну дію, формуючи різну кількість бляшок на твердому поживному середовищі [283]. Найбільш важливими факторами впливу на літичну активність бактеріофагів можуть бути: підвищена або знижена температура, коливання рН, тривалість зберігання тощо [458].

Основною метою цього дослідження було оцінити вплив температури та рН середовища на активність бактеріофагів *in vitro*.

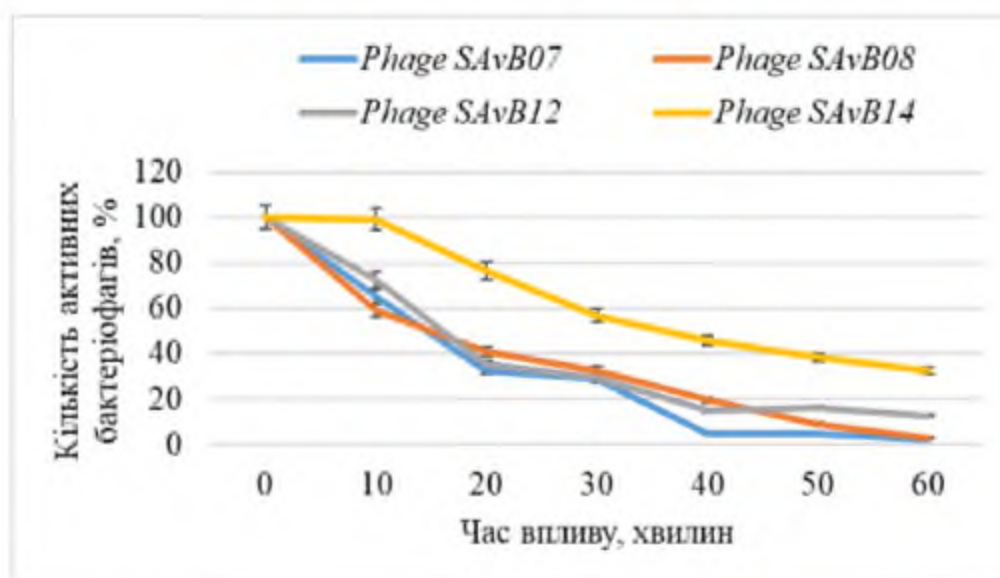
Вплив температури на фагову активність має велике значення [94, 320, 465]. При тестуванні впливу ступеня прогрівання на фаги оцінюють їх здатність якнайдовше зберігати свої властивості при найвищих температурах. Це пояснюється тим, що в природніх умовах застосування фагів вимагає толерантності до коливання температурних режимів. Зміна температури може виникнути через погодні умови при зберіганні чи транспортуванні фагових препаратів, фізіологічні зміни в організмі тварин.

Для визначення впливу високих температур на активність виділених фагів готували розведення кожного штаму з розрахунку 10^5 БУО/мл. Кожне розведення поміщали у водяну баню за різних температур: 35 (контроль), 45, 55, 65 °С. Через кожні 10 хвилин проводили відбір певної аліквоти досліджуваних зразків, додавали тест-культуру і висівали методом двохшарового агару. Чашки інкубували за температури 37 °С протягом 18 – 24 год. Дослідження проводили в трьох повторах.

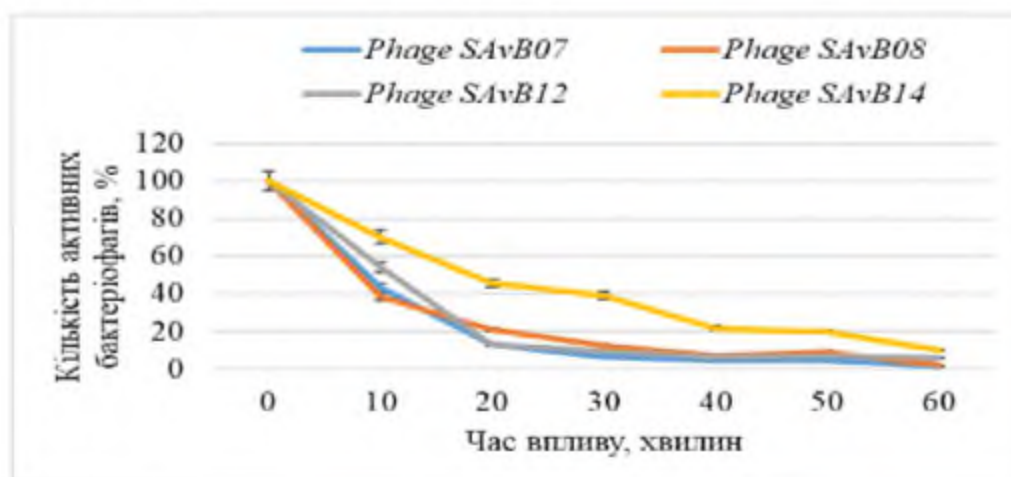
За результатами досліджень встановлено, що підвищення температури в поєднанні зі збільшенням часу впливу цієї температури знижує літичну активність виділених фагів (рис. 3.13).



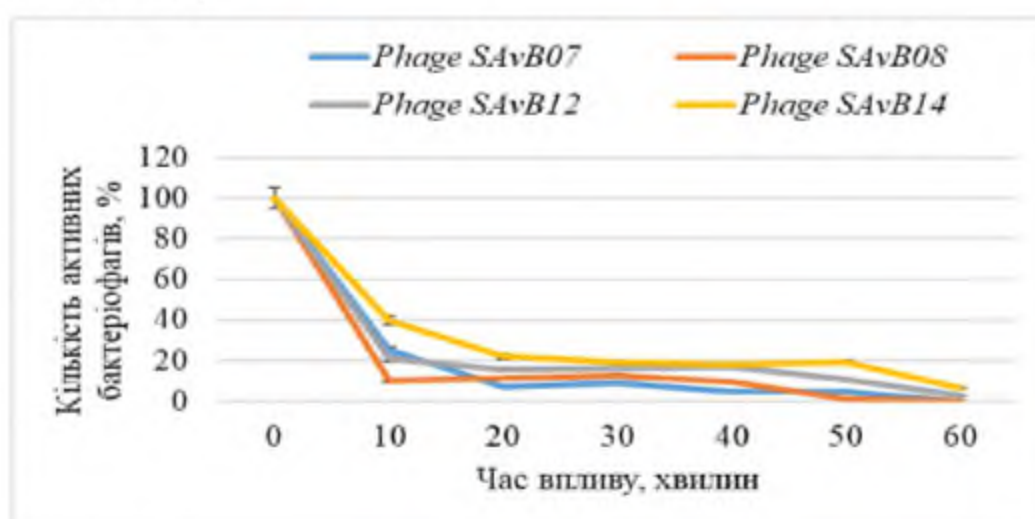
А - температура 35 ± 2 °С (контроль);



Б – 45±2 °C;



В – 55±2 °C;



Г – 65±2 °C

Рис. 3.13. Вплив температури на літичну активність бактеріофагів. Дані представлені як середнє значення± стандартне відхилення.

Так, з даних, представлених на рис. 3.13 видно, що кількість активних фагів за впливу температури 45 °С протягом перших 10 хвилин знизилася на 40,7 – 27,6 %. Лише кількість активного фагу *Phage SAvB14* була майже незмінною. Температура 55 – 65 °С згубно діяла на всі досліджувані штами бактеріофагів. За перші 10 хвилин впливу кількість життєздатних фагів знизилася на 29,9 – 61,7 та 60,3 – 90,1 % відповідно. В подальшому фагова репродуктивна активність відносно стабілізувалася в усіх діапазонах температур, але залишалася низькою. Крім того, були відзначені відмінності між кожним фагом. Найбільш стійким до впливу температури виявився *Phage SAvB14* – його активність була в середньому вища на 15,6 – 33,9 % порівняно з іншими фагами, взятими в дослід.

pH середовища, в якому розмножується фаг, також є важливим чинником [546]. Оптимальні значення водневого показника для росту і розмноження бактеріофагів в умовах *in vitro* мають бути максимально наближеними до природнього середовища, з якого виділений даний фаг.

Для визначення впливу pH середовища на активність фагів живильний бульйон було відкалібровано (використовуючи 1 М HCl і NaOH) відповідно до наступних діапазонів pH: 2, 4, 6, 8, 10, 12 і 14. Кожне розведення бактеріофагів додавали до відкаліброваного бульйону з розрахунку, щоб в кінцевому результаті вміст фагів був 10^5 БУО/мл. Зразки витримували при кімнатній температурі протягом 1 години. Потім відбирали аліквоти досліджуваних зразків, додавали чутливу добову культуру і висівали методом двошарового агару. Чашки інкубували за температури 37 °С протягом 18-24 год. Дослідження проводили в трьох повторях.

Результати з визначення впливу коливання pH середовища на бактеріофаги *S. aureus var. bovis* наведено на рис. 3.14.

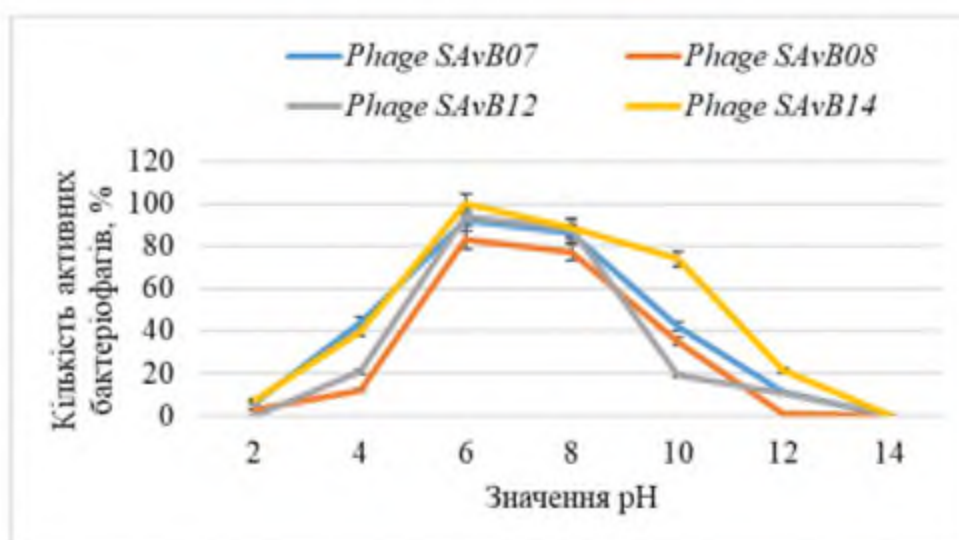


Рис. 3.14. Вплив рН середовища на літичну активність бактеріофагів; дані представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення.

Усі досліджувані фаги (*Phage SAvB07*, *Phage SAvB08*, *Phage SAvB12*, *Phage SAvB14*) виявилися чутливими до зміни рН середовища. Згубно на активність фагів діяли як низькі та і високі значення рН. Найбільшу стабільність вони проявили при значенні рН в межах 6 - 7, тобто близьке до нейтрального. Поза цими значеннями активність значно знижувалася.

Отже, проведені дослідження визначили оптимальні умови для зберігання фагової активності бактеріофагів *Phage SAvB07*, *Phage SAvB08*, *Phage SAvB12*, *Phage SAvB14*. Відхилення від стандартних умов зберігання фагів призвели до різкого зниження фагової активності. Проте, фаг *Phage SAvB14* більш стійкіший до впливів високих температур і коливання рН, порівняно з іншими дослідженими фагами, а отже є кращим для створення препарату для лікування стафілококового маститу корів.

Одним з важливих чинників, які можуть впливати на зниження літичної активності бактеріофагів є вплив хлороформу. Для визначення чутливості виділених нами бактеріофагів до дії хлороформу ми вносили в пробірки з фаголізатом хлороформ у співвідношенні 1:10. Оброблені пробірки постійно струшували та витримували при кімнатній температурі протягом 15, 30 та 45 хвилин. Контролем служили фаголізати необроблені хлороформом. Титр фагів

визначали за методом Грація. Дослідження проводили в трьох повторях (табл. 3.26).

Таблиця 3.26

Вплив хлороформу на літичну активність бактеріофагу *Phage SAvB14* при зберіганні, lg, $x \pm SE$, БУО/мл

Час впливу, хв	Титр фагів оброблених хлороформом			
	<i>Phage SAvB07</i>	<i>Phage SAvB08</i>	<i>Phage SAvB12</i>	<i>Phage SAvB14</i>
15	5,0 \pm 3,99	5,1 \pm 4,02	5,1 \pm 4,03	5,1 \pm 4,01
30	4,8 \pm 3,74	5,0 \pm 3,90	4,9 \pm 3,85	5,1 \pm 3,98
45	4,3 \pm 3,25	4,9 \pm 3,80	4,6 \pm 3,52	5,0 \pm 3,98
Контроль	5,2 \pm 4,10	5,3 \pm 4,18	5,3 \pm 4,22	5,1 \pm 4,00

Як видно, з даних представлених в табл. 3.26 титр бактеріофагів за впливу на них хлороформу протягом 45 хвилин майже не змінювався. Тому можна вважати, що нгтами бактеріофагів *Phage SAvB07*, *Phage SAvB08*, *Phage SAvB12*, *Phage SAvB14* стійкі до хлороформу.

Протилежним чинником до термічної обробки є вплив низьких температур. Відомо, що режими зберігання бактеріофагів мають важливе значення при розробці технологічних параметрів виготовлення та зберігання біопрепаратів на основі бактеріофагів. Визначення здатності бактеріофагів зберігати свою активність з часом проводили наступним чином. Готували розведення з розрахунку 10^5 БУО/мл. Кожне розведення зберігали за різних температур: 0, 4, 8 °С. Через певні проміжки часу відбирали аліквоти зразків і відсівали їх методом двошарового агару. Чашки інкубували за температури 37 °С протягом 18-24 год. Дослідження проводили в трьох повторях.

Оскільки бактеріофаг *Phage SAvB14* продемонстрував крапцю стійкість до впливу високих температур та рН, ми також визначили зміни літичної активності стафілококових бактеріофагів в процесі зберігання. Брالی закриті в стерильних флаконах без додавання консерванту монофаги та витримували їх за температур 0, 4 та 8 °С (табл. 3.27).

Таблиця 3.27

**Вплив температури на літичну активність бактеріофагу *Phage SAvB14*
при зберіганні, $\log, x \pm SE$, БУО/мл**

Час виживу	Температура, °С		
	0	4	8
24 год	5,1±4,07	5,1±4,07	5,1±4,07
7 днів	5,0±3,97	5,1±4,01	5,0±3,99
14 днів	4,9±3,94*	5,0±3,94*	5,0±3,95*
1 місяць	4,8±3,78	5,0±3,87	4,9±3,91
3 місяці	4,7±3,67*	4,9±3,87*	4,8±3,78*

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з початковою кількістю.

З даних табл. 3.27 видно, що активність бактеріофагу *Phage SAvB14* протягом першої доби зберігання за низьких температур не змінювалася. В подальшому літичний вплив фагів дещо ослаб. Так, через 14 днів зберігання виявили його зниження в середньому в 1,3 ($p < 0,05$) раза за температури 4 - 8 °С. Витримка протягом трьох місяців зменшила активність фагу в 1,5 – 1,7 ($p < 0,05$) раза, порівняно з початковою кількістю активних віріонів.

Дещо нижча активність спостерігалася при 0 °С – кількість фагів через 14 днів складала $4,9 \pm 3,94 \lg$ БУО/мл, через 3 місяці була в 2,4 ($p < 0,05$) раза нижчою, порівняно з їх початковою кількістю. Дана температура більш згубно впливала на літичну активність бактеріофагів *Phage SAvB14*, оскільки кількість життєздатних вірусів була меншою в 1,4 – 1,6 ($p < 0,05$) раза у порівнянні з температурою 4 та 8 °С. Подальше 5-6 кратне пасажування бактеріофагів на індикаторних культурах дозволяло відновити їх вихідний титр.

Отже, результати досліджень стійкості фагів до температури та зміни рН показали, що бактеріофаг *Phage SAvB14* частково втрачав свою активність в інтервалі температур 45 - 65 °С, що є важливим фактором при технологічних особливостях виготовлення фагового препарату. Вибір температурних

режимів зберігання препаратів бактеріофагів може впливати на їх стабільність у часі. Найбільш оптимальною температурою для зберігання фагу *Phage SAvB14* є 4 – 8 °С.

Результати роботи, які описані в даному підрозділі висвітлено в наукових працях:

Horiuk Y., Kukhtyn M., Horiuk V., Kernychnyi S., Tarasenko L. Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus variant bovis*. *Veterinárni Medicína*, 2020. Vol. 65(10). P. 421–426. Doi: <https://doi.org/10.17221/55/2020-VETMED> [142];

38. Horiuk Y. Characterization of the biological properties of bacteriophages *Staphylococcus aureus variant bovis*. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 2019. Vol. 21(96). P. 47–52. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9608> [275];

Horiuk Y.V., Kukhtyn M.D., Horiuk V.V., Mizyk V.P. Effect of Temperature on the lytic activity of Bacteriophage *Phage SAvB14*, specific for *Staphylococcus aureus variant bovis*. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 2019. Vol. 4. P. 37–40. Doi: <https://doi.org/10.31890/vttp.2019.04.07> [207].

3.2.4. Фармакологічна дія різних титрів *Phage SAvB14* на кількість *Staphylococcus aureus variant bovis*

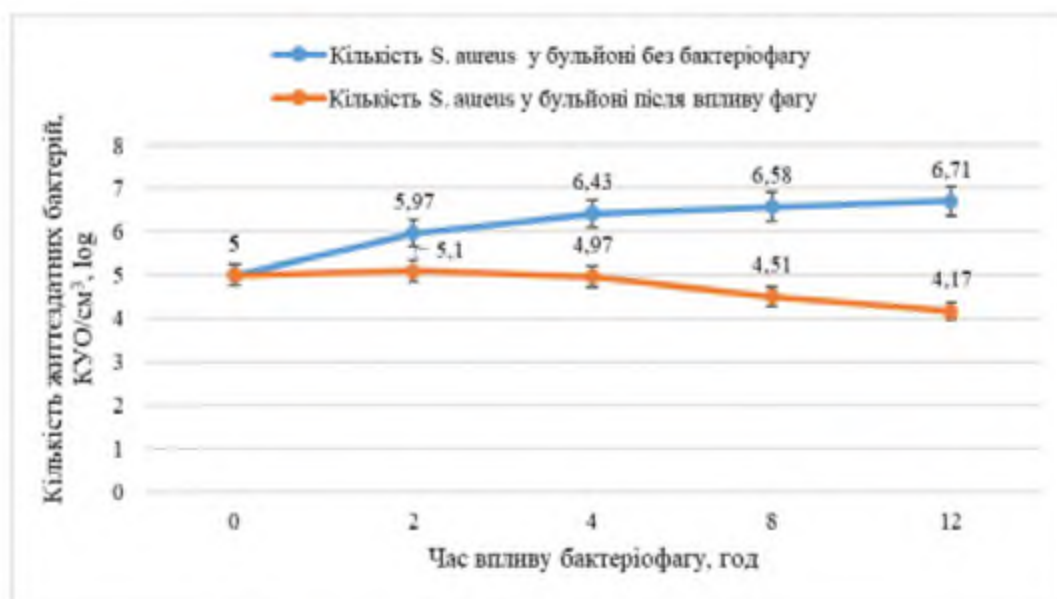
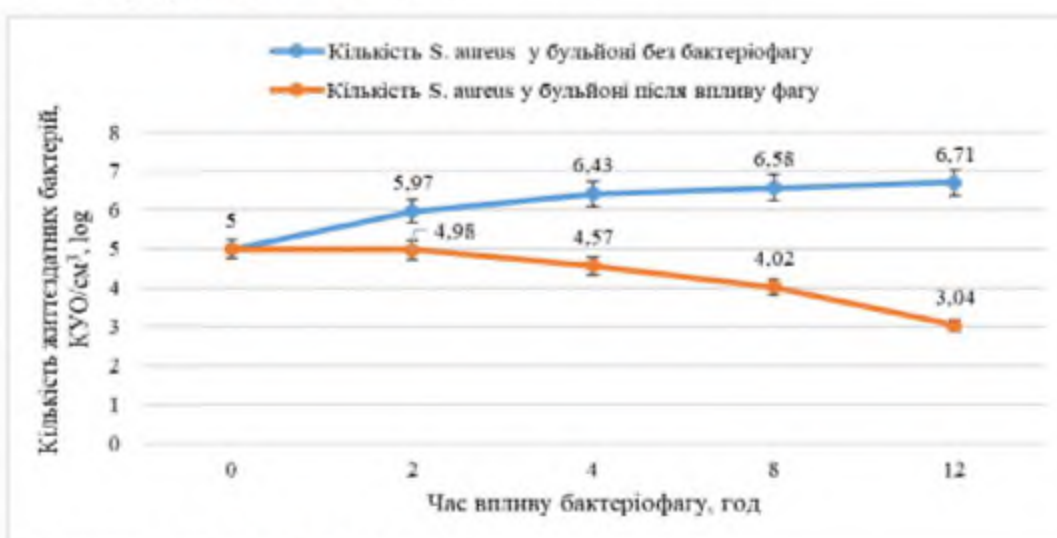
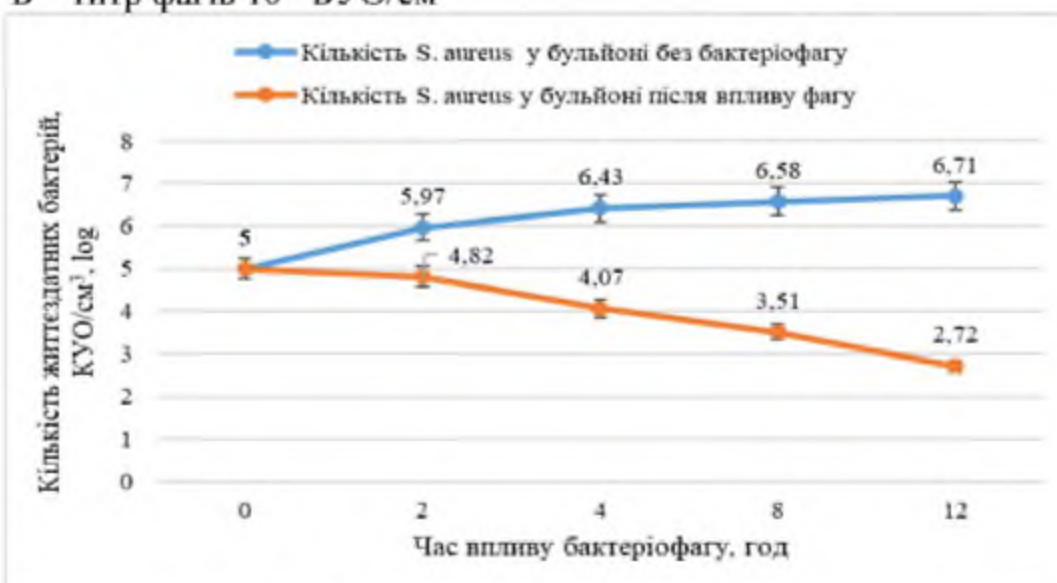
Метою фаготерапії є максимізація кількості фагів, які потрапляють та заражують якомога більше бактерій, що знижує поріг інфікованості, не викликаючи при цьому побічних ефектів [105, 232]. Для цього не тільки титр фагів, але і титр бактерій повинен бути достатньо високим. При цьому титр фагів повинен проходити «поріг поглинання», тобто коли реплікація фагів перевищує реплікацію бактерій. Це може бути досягнуто за допомогою традиційного дозування препарату (пасивне лікування), що забезпечує один

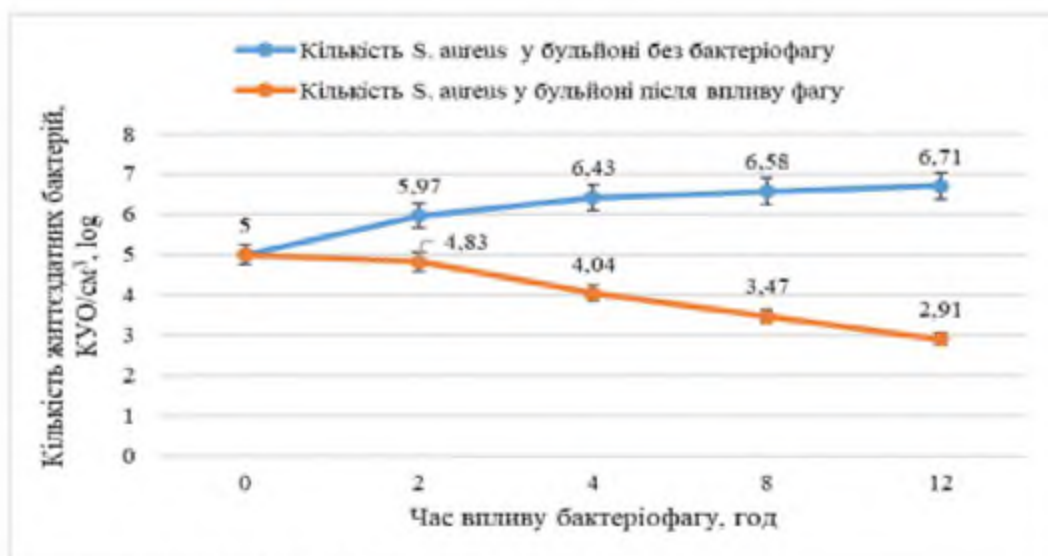
цикл фагової інфекції, або ж за допомогою наступних циклів реплікації фагів, тобто активного лікування [212, 232].

Існує ряд специфічних особливостей щодо динаміки комплексу фаг-бактерія, які необхідно враховувати в контексті фаготерапії. Відомо, що висока щільність фагів необхідна для того, щоб зупинити ріст чутливих до них бактерій. Крім того, знищення бактерій фагом залежить від кількості фагових частинок, що адсорбувалися на цільових мікроорганізмах [34, 554]. Зв'язування фагів з бактеріями може бути змодельовано як простий процес першого порядку стосовно концентрації бактерій та фагової популяції відповідно [28]. Все ж є необхідність в більш широкому розумінні механізмів їх взаємодії, що допоможе краще сформулювати основні принципи створення препарату для лікування маститу корів та схем його введення. Тому нами проведено дослідження з визначення динаміки популяції фаг-бактерія при використанні різних титрів бактеріофагу *SAvB14* та чутливої до нього культури *S. aureus var. bovis*. Для цього вносили 1 мл фаголізату з титрами фагів 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} БУО/мл у 9 мл поживного бульйону з добовою культурою *S. aureus var. bovis* та витримували протягом 12 год. Через кожні дві години відсівали для визначення кількості *S. aureus*. Кількість життєздатних стафілоkokів визначали шляхом посіву їх на середовище BD Baird-Parker Agar (HiMedia, Індія) згідно стандартних методик. Дослідження проводили в трьох повторях.

На рис. 3.15 наведено результати дослідження впливу різних титрів бактеріофагу *Phage SAvB14* на штами чутливих бактерій *S. aureus var. bovis* протягом 12-ти годин.

З даних рис. 3.15 видно, що титр бактеріофагів прямопропорційно впливав на кількісний вміст *S. aureus var. bovis*. Вміст золотистого стафілококу вже протягом перших двох годин взаємодії з літичними фагами *SAvB14* зменшувався. Так, кількість життєздатних клітин бактерій при титрі 10^{-6} БУО/см³ зменшилася у 1,2 раза ($p < 0,05$), при титрі 10^{-7} , 10^{-8} та 10^{-9} БУО/см³ приблизно у 1,3 раза ($p < 0,05$).

А – титр фагів 10^{-6} БУО/см³;Б – титр фагів 10^{-7} БУО/см³В – титр фагів 10^{-8} БУО/см³;



Г – титр фагів 10^{-9} БУО/см³.

Рис. 3.15. Вплив різних титрів бактеріофагів на кількість життєздатних клітин *S. aureus var. bovis*.

Проте, при збільшенні часу взаємодії ми спостерігали, що чим більший був початковий титр фагів, тим інтенсивніше прогресувала фагова інфекція. Вже через 12 годин впливу бактеріофагів на чутливі до нього бактерії, їх кількість при титрі 10^{-8} БУО/см³ була меншою у 1,5 та 1,1 раза ($p < 0,05$), ніж при титрах 10^{-6} та 10^{-7} БУО/см³ відповідно.

Аналіз отриманих нами даних показав, що внесення фагу з титром 10^{-8} БУО/см³ у 1,2 раза ($p < 0,05$) ефективніше знищував *S. aureus var. bovis*, ніж при внесенні фаголізату з титром 10^{-7} БУО/см³, та у 1,5 раза ($p < 0,05$) порівняно з титром 10^{-6} БУО/см³. Результати, отримані при дослідженні впливу фагу з титром 10^{-9} БУО/см³ майже не відрізнялися від тих, що отримані при випробуванні титру 10^{-8} БУО/см³.

Отже, при розробці препарату на основі бактеріофагів ми рекомендуємо використовувати фаголізат з титром не менше 10^{-7} та 10^{-8} БУО/см³. Введення такої кількості фагів може забезпечити необхідний терапевтичний ефект при лікуванні захворювань, спричинених *S. aureus var. bovis*.

Результати роботи, які описані в даному підрозділі висвітлено в науковій праці:

Horiuk Y.V. The effect of various titers of bacteriophages on the amount of *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 2020. Vol. 5. P. 26–31. Doi: <https://doi.org/10.31890/vtpp.2020.05.05> [280]

3.2.5. Інтенсивність фармаколітичної дії *Phage SAvB14*, залежно від кількості чутливих клітин

Відомо, що для ефективної фагової терапії слід застосовувати лише літичні бактеріофаги [527]. Однак, деякі літичні фаги зазнають явища, відомого як інгібування лізису [262]. Хронічно інфіковані фагами клітини продукують потомство, яке повільно відходить від клітини або передається дочірнім клітинам без їх лізису. При цьому не відбувається ні інтеграція геному фага в геном господаря, ні лізис бактерії. Дане явище розглядається як хронічна фагова інфекція або «стан носія». Вважається, що дана стратегія допомагає фагам зберігатися в господарі, коли не вистачає живильних речовин для підтримки росту мікробів або висока кількість віріонів в позаклітинному середовищі. Чим більше чутливих до фагів бактерій наявних в середовищі, тим більша ймовірність того, що вільний фаг стане адсорбованим. Тому важливою характеристикою терапевтичних бактеріофагів є їх здатність викликати фагову інфекцію при різних кількостях чутливих бактеріальних клітин.

Для оцінки впливу кількості життєздатних бактерій *Staphylococcus aureus* var. *bovis* на інтенсивність фагової інфекції, спричиненої бактеріофагом *Phage SAvB14*, вносили 1 мл фаголізату з титром фагів 10^5 БУО/мл у 9 мл поживного бульйону з відповідною кількістю добової культури досліджуваних мікроорганізмів. Кількість життєздатних стафілококів визначали шляхом посіву їх на середовище BD Baird-Parker Agar (Himedia, Індія) згідно стандартних методик. Дослідження проводили в трьох повторах.

У табл. 3.28 наведено результати дослідження впливу бактеріофагу *Phage SAvB14* у концентрації 10^4 БУО/мл на штами чутливих бактерій *S. aureus* var. *bovis* протягом 2-х годин.

**Вплив бактеріофагу *Phage SA_vB14* на *S. aureus var. bovis* протягом 2
годин, $\bar{x} \pm SE$**

Початкова кількість <i>S. aureus var. bovis</i> , КУО/см ³	Титр фага, БУО/мл	Кількість <i>S. aureus var. bovis</i> після впливу фага, КУО/см ³
$5,0 \pm 0,1 \times 10^2$	10^4	$4,5 \pm 0,1 \times 10^2$
$1,0 \pm 0,07 \times 10^3$	10^4	$8,1 \pm 0,1 \times 10^2$ *
$1,0 \pm 0,008 \times 10^4$	10^4	$7,6 \pm 0,1 \times 10^3$ *
$1,0 \pm 0,002 \times 10^5$	10^4	$7,5 \pm 0,1 \times 10^4$ * Δ

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з початковою кількістю; Δ – порівняно до кількості *S. aureus* ($4,5 \pm 0,1$) $\times 10^2$ КУО

Дані табл. 3.28 вказують на наявну залежність інтенсивності фагової інфекції від початкового вмісту *S. aureus* у середовищі. Після двох годин взаємодії фагу з мікробними клітинами найповільніше розповсюдження фагової інфекції відбувалося у середовищі з початковим вмістом *S. aureus* ($5,0 \pm 0,1$) $\times 10^2$ КУО/мл. За цей період часу кількість стафілококів зменшилася в 1,1 раза. Збільшення початкової кількості *S. aureus* у середовищі до ($1,0 \pm 0,07$) $\times 10^3$ КУО/мл підвищило інтенсивність розповсюдження фагової інфекції, так як кількість мікробних клітин через дві години зменшилася в 1,23 раза ($p < 0,05$). Аналогічна закономірність щодо поширення фагової інфекції відмічається і за більшої початкової кількості *S. aureus* у середовищі ($10^4 - 10^5$ КУО/мл). За такого початкового вмісту мікробних клітин дія фагу протягом двох годин зумовила зменшення кількості стафілококів, в середньому 1,3 раза ($p < 0,05$). Це вказує на лізис бактерій через швидке поширення фагової інфекції серед стафілококів.

У табл. 3.29 наведено дані зміни кількості *S. aureus* після чотирьохгодинної дії бактеріофагу.

З даних табл. 3.29 видно, що інтенсивність поширення фагової інфекції серед стафілококів проходить найшвидше у середовищі з найбільшою початковою кількістю мікробних клітин. У поживному середовищі з початковою кількістю *S. aureus* $1,0 \pm 0,002 \times 10^5$ КУО/мл відмічали в 1,6 раза

($p < 0,05$) швидшу загибель мікробних клітин, порівняно з середовищем з кількістю $5,0 \pm 0,1 \cdot 10^2$ КУО/мл та в 1,5 раза ($p < 0,05$) швидшу, порівняно з кількістю $1,0 \pm 0,07 \cdot 10^3$ КУО/мл. За початкового вмісту *S. aureus* у поживному бульйоні $1,0 \pm 0,008 \cdot 10^1$ КУО/мл інтенсивність поширення фагової інфекції також була в 1,5 та 1,4 раза ($p < 0,05$) швидша, ніж у бульйоні з кількістю стафілококів $5,0 \pm 0,1 \cdot 10^2$ КУО/мл та $1,0 \pm 0,07 \cdot 10^3$ КУО/мл відповідно. Це вказує на те, що за більшої кількості мікробних клітин у середовищі відбувається швидший контакт вірусу і бактерії, а це призводить до інтенсивності поширення фагової інфекції.

Таблиця 3.29

Вплив бактеріофагу *Phage SAvB14* на *S. aureus var. bovis* протягом 4 годин, $x \pm SE$

Початкова кількість <i>S. aureus var. bovis</i> , КУО/см ³	Титр фага, БУО/мл	Кількість <i>S. aureus var. bovis</i> після впливу фага, КУО/см ³
$5,0 \pm 0,1 \cdot 10^2$	10^1	$1,8 \pm 0,07 \cdot 10^2$
$1,0 \pm 0,07 \cdot 10^3$	10^1	$3,2 \pm 0,1 \cdot 10^2$
$1,0 \pm 0,008 \cdot 10^1$	10^1	$2,3 \pm 0,1 \cdot 10^{3*}$
$1,0 \pm 0,002 \cdot 10^5$	10^1	$2,2 \pm 0,05 \cdot 10^{1*}$

Примітка: * – порівняно до початкової кількості *S. aureus* $4,5 \pm 0,1 \cdot 10^2$ КУО/мл та $1,0 \pm 0,07 \cdot 10^3$ КУО/мл

Водночас, з результатів табл. 3.30 видно, що протягом 24 та 48 год впливу фагу на мікробні клітини у варіантах дослідів з початковою кількістю *S. aureus* до $1,0 \pm 0,008 \cdot 10^1$ КУО/мл відбувся повний лізис бактерій і їх з поживного середовища не виділяли. За початкової кількості стафілококів в бульйоні $1,0 \pm 0,002 \cdot 10^5$ КУО/мл через 48 год дії бактеріофагу повного лізису мікробних клітин не відмічали. Кількість *S. aureus* зменшилася на декілька порядків і становила $7,1 \pm 0,2 \cdot 10^2$ КУО/мл.

Вплив бактеріофагу *Phage SAyB14* на *S. aureus var. bovis* протягом 24 та 48 годин, $\bar{x} \pm SE$

Початкова кількість <i>S. aureus var. bovis</i> , КУО/см ³	Титр фага, БУО/мл	Кількість <i>S. aureus var. bovis</i> після впливу фага, КУО/см ³	
		24 год	48 год
$5,0 \pm 0,1 \cdot 10^2$	10^4	0	0
$1,0 \pm 0,07 \cdot 10^3$	10^4	0	0
$1,0 \pm 0,008 \cdot 10^4$	10^4	0	0
$1,0 \pm 0,002 \cdot 10^5$	10^4	$7,8 \pm 0,3 \cdot 10^2$	$7,1 \pm 0,2 \cdot 10^2$

Отримані дані вказують на те, що інтенсивність перебігу фагової інфекції на чутливих штаммах стафілококів залежить від початкової кількості мікробних клітин у середовищі. За незначної концентрації бактерій інтенсивність фагової інфекції проходить повільніше, ніж у середовищі із великою концентрацією мікроорганізмів. Проте, у середовищі з незначним вмістом стафілококів відмічаємо повний лізис бактеріальних клітин через 24 год дії фагу, а у середовищі з великою кількістю повного лізису стафілококів не відмічається навіть через 72 год взаємодії бактерій з фагом. Це дає підставу вважати, що при великій концентрації бактерій відбувається поступове зниження живильних речовин у середовищі, внаслідок чого фаги можуть переходити у стан лізогенії.

Отже, підсумовуючи результати дослідження, можна відзначити перспективність ефективного використання виділеного нами специфічного стафілококового бактеріофагу *Phage SAyB14* при маститі корів, спричиненому *S. aureus var. bovis*. Однак, при підборі дози і концентрації бактеріофагу необхідно враховувати особливості взаємодії фаг-бактерія для забезпечення ефективного лікування.

Результати роботи, які описані в даному підрозділі висвітлено в науковій праці:

Horiuk Y., Horiuk V., Kukhtyn M., Tsvihun A., Kernychnyi S. Characterization of lytic activity of *Phage SAvB14* on *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2020. Vol. 7(3). P. 509–516. Doi: <http://doi.org/10.5455/javar.2020.g447> [146].

3.2.6. Фармакологічна активність виділених бактеріофагів *Staphylococcus aureus* variant *bovis* щодо культур золотистого стафілококу різного біологічного походження

Фаги, які мають високу літичну активність та широкий діапазон господарів є більш перспективними в терапевтичному відношенні. Це дослідження було проведено для визначення літичних властивостей та оцінки діапазону господарів бактеріофагів *S. aureus* var. *bovis*, які виділені на молочних фермах та можуть бути використані для створення препарату для лікування маститу корів.

Попередніми нашими дослідженнями встановлено, що препарати на основі бактеріофагів промислового виробництва неефективні щодо культур золотистих стафілококів, виділених з молочних продуктів та від корів, хворих маститом. Це свідчить про те, що коло господарів штамів бактеріофагів, використаних при виробництві препаратів, не включає штами *S. aureus* var. *bovis*. Тому ми провели визначення чутливості культур золотистого стафілококу різного біологічного походження до фагів *S. aureus* var. *bovis*, які виділені на молочних фермах.

У табл. 3.31 наведено чутливість *S. aureus* різного походження до бактеріофагів, які були виділені нами на молочних фермах.

Дані, наведені в табл. 3.31 вказують на те, що бактеріофаги (*Phage SAvB14*, *Phage SAvB12*, *Phage SAvB08*, *Phage SAvB07*), які виділені на молочних фермах, характеризуються певною специфічністю літичної дії відносно стафілококів, виділених з різних біотопів. Так, найбільшу кількість чутливих клітин стафілококів відмічали за дії бактеріофага *Phage SAvB14*, даний фаг діяв літично на $92,7 \pm 8,3$ % золотистих стафілококів, виділених з

секрету молочної залози корів з ознаками маститу та на 69,2±6,4 % культур, виділених з молочних продуктів, які реалізуються на агропродовольчих ринках. При цьому *Phage SAVB14* проявляв активну літичну дію щодо людських стафілококів лише у 35,1±3,1 % випадків та не впливав на музейні штами. Менш активними щодо стафілококів, виділених з різних біотопів, виявилися інші досліджені бактеріофаги. Зокрема, *Phage SAVB12*, *Phage SAVB08*, *Phage SAVB07* у 1,2 – 1,7 раза менше лізували культури, виділені з молочної залози корів, хворих маститом, та у 6 - 18 разів культури, виділені з молочних продуктів, порівнюючи з *Phage SAVB14*. Незначну антистафілококову дію відмічали у *Phage SAVB12*, він лізував 16,2±1,3 % культур, виділених з біотопів людини. Також виділені на молочних фермах фаги (*Phage SAVB12*, *Phage SAVB08*, *Phage SAVB07*) не проявляли активності щодо музейних штамів *S. aureus* №209-Р, *S. aureus* (ATCC 25923) та золотистих стафілококів, виділених з біотопу людини.

Таблиця 3.31

Чутливість *S. aureus* різного походження до бактеріофагів, виділених на молочних фермах, %, $\bar{x} \pm SE$, n = 198

Походження штамів	Кількість досліджених	Досліджені бактеріофаги			
		<i>Phage SAVB14</i>	<i>Phage SAVB12</i>	<i>Phage SAVB08</i>	<i>Phage SAVB07</i>
Культури, виділені з секрету молочної залози корів з ознаками маститу	96	92,7±8,3	75,0±6,7	71,8±5,7	54,2±4,3
Культури, виділені з молочних продуктів, які реалізуються на агропродовольчих ринках	26	69,2±6,4	11,5±1,0	3,8±0,3	7,7±0,6
Культури, виділені з біотопів людини з різними запальними процесами	74	35,1±3,1	16,2±1,3	0	0
Музейні штами: <i>S. aureus</i> №209-Р, <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	2	0	0	0	0

Підтвердив результати цього дослідження і вплив бактеріофагів на різні біотики золотистого стафілококу. У табл. 3.32 наведено результати досліджень літичної дії виділених фагів до стафілококів різних біотипів.

Таблиця 3.32

Спектр літичної дії виділених бактеріофагів, %, $\bar{x} \pm SE$, n = 101

Досліджувані штами бактеріофагів	Кількість лізованих культур			
	<i>S. aureus var. bovis</i> , n – 68		<i>S. aureus var. hominis</i> , n – 33	
	n	%	n	%
<i>Phage SAvB07</i>	17	25,0	0	0
<i>Phage SAvB08</i>	21	30,8	0	0
<i>Phage SAvB12</i>	31	45,6	0	0
<i>Phage SAvB14</i>	64	94,1	1	3,1

Встановлено, що фаги проявляли різну літичну активність до культур *S. aureus var. bovis*. Найбільше лізувалися клітини стафілококів під дією фагу *SAvB14* – 94,1 % культур, інші три виділені фаги (*SAvB07*, *SAvB08* і *SAvB12*) лізували даний біотип золотистого стафілококу від 25,0 до 45,6 % випадків. Клітини *S. aureus var. hominis* практично не лізувалися фагами, які виділені від корів, хворих на мастит, тільки до фагу *SAvB14* були чутливі 3,1 % культур.

Це дослідження дало змогу підтвердити специфічність господарів для *SAvB14*, що є хорошою характеристикою для створення препарату на основі бактеріофагів для лікування маститу у корів.

Враховуючи те, що в етіології маститу корів поряд із загальноновизнаним збудником *S. aureus* приймають участь інші види роду *Staphylococcus*, нами було досліджено літичну активність виділених фагів щодо культур *Staphylococcus spp.*, ізолюваних на молочних фермах (табл. 3.33).

З даних, представлених у табл. 3.33 видно, що досліджені нами бактеріофаги здатні інфікувати не лише *S. aureus*, але і інші види стафілококів. Водночас, найбільш літично активний серед виділених фагів був *Phage SAvB14* за дії якого лізувалися від 41,5 до 62,1 % ідентифікованих культур

коагулазонегативних стафілококів. При цьому такі види як *S. saprophyticus* і *S. xylosus*, в середньому, в 60 % виявилися чутливими до *Phage SAvB14*.

Таблиця 3.33

Чутливість *Staphylococcus spp.* до бактеріофагів, виділених на молочних фермах, %, $x \pm SE$, n =161

Вид стафілококів	Кількість досліджених культур	Досліджені бактеріофаги			
		<i>Phage SAvB14</i>	<i>Phage SAvB12</i>	<i>Phage SAvB08</i>	<i>Phage SAvB07</i>
<i>S. epidermidis</i>	39	48,7±4,3	0	20,5±1,6	0
<i>S. haemolyticus</i>	41	41,5±3,3	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	58	62,1±4,8	0	48,2±4,3	36,2±3,2
<i>S. xylosus</i>	23	60,8±4,8	65,2±5,8	39,1±3,1	69,5±5,5

Виділений *Phage SAvB12* виявився найменш літичний відносно коагулазонегативних стафілококів, зокрема такі види як *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* і *S. saprophyticus* не лізувалися ним. Водночас, до даного фагу були чутливі 65,2±5,8 % культур виду *S. xylosus*.

Виділені *Phage SAvB08* і *Phage SAvB07* практично не діяли на види *S. epidermidis* і *S. haemolyticus*. У той же час, *Phage SAvB08* лізував 48,2±4,3 % культур виду *S. saprophyticus* і 39,1±3,1 % *S. xylosus*. *Phage SAvB07* дані види стафілококів лізував у 36,2±3,2 і 69,5±5,5 % випадків, відповідно.

Отже, проведені дослідження вказують на те, що для ефективної фагової терапії потрібно враховувати біологічне походження штамів стафілококів і, відповідно, використовувати бактеріофаги, які є специфічними для своїх господарів. Найбільш широким діапазоном господарів серед досліджених бактеріофагів, які виділені на молочних фермах, володіє *Phage SAvB14*, що робить його кращим кандидатом при створенні фагового препарату для

лікування корів за маститу. В якості додаткового господаря для його реплікації можна використовувати *S. xylosus*, який є непатогенним.

Результати роботи, які описані в даному підрозділі висвітлено в науковій праці:

Horiuk Y., Kukhtyn M., Kernychnyi S., Laiter-Moskaliuk S., Prosyanyi S., Boltyk N. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* cultures of different biological origin to commercial bacteriophages and phages of *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Veterinary World*, 2021. Vol. 14(6). P. 1588–1593. Doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.1588-1593 [484].

3.2.7. Антимікробна дія бактеріофагу *Phage SAvB14* на біоплівки, сформовані *Staphylococcus aureus* variant *bovis*

Останнім часом багато вчених висловлюють припущення, що з екологічних і фізіологічних причин бактеріофаги, ймовірно, будуть більш ефективними, ніж антибіотики в знищенні бактерій у біоплівці [115, 568]. Вплив фагів на біоплівки включає початкову стадію бактеріальної адсорбції, за якою слідує бактеріальна інфекція. Зараження фагом призводить до загибелі чутливих бактерій та до їх лізису. Видалення біоплівкових бактерій за допомогою лізису призводить до фізіологічних змін серед бактерій в глибоких шарах біоплівки, що дозволяє цим бактеріям ефективніше підтримувати подальшу інфекцію фагів [91, 515].

Багато фагів продукують полісахаридні деполімерази і при розвитку фагової інфекції ферменти розкладають капсульні полісахариди (CPSs), О-полісахаридні ланцюги ліпополісахаридних (LPS) молекул або позаклітинні полісахариди (EPSs), які утворюють матрицю біоплівки [97]. Таким чином, полегшується проникнення фагів у більш глибокі шари біоплівки з подальшим лізисом цільових бактерій. Тому ми визначили вплив бактеріофагу *Phage SAvB14* на молоді та зрілі біоплівки, сформовані *S. aureus* var. *bovis*.

Так, за впливу бактеріофагу на 24-годинні біоплівки *S. aureus var. bovis*, відмічаємо зростання на $10,0 \pm 0,3$ % оптичної густини розчину барвника упродовж 12 год інкубації у порівнянні з початковою їх густиною (рис. 3.16).

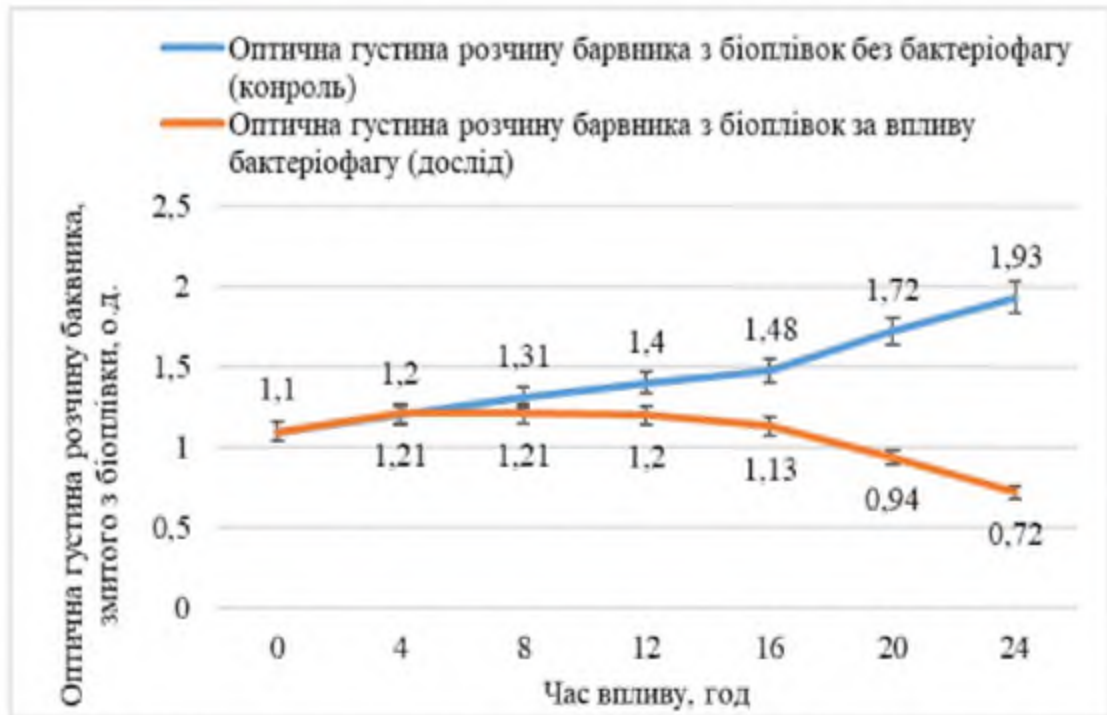


Рис. 3.16. Вплив бактеріофагу на 24-годинну біоплівку *Staphylococcus aureus variant bovis*, дані представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення

Упродовж наступних годин інкубації відбулося поступове зниження оптичної густини барвника з біоплівок порівняно з початковою густиною. На 28 годину контакту бактеріофагу з біоплівкою, утвореною штамом *S. aureus var. bovis*, відбулося зменшення густини барвника на $63,7 \pm 2,4$ % порівняно з біоплівкою, яка не піддавалася впливу бактеріофагу та на $34,5 \pm 0,7$ %, порівняно з початковою густиною. За подальшого впливу бактеріофагу на біоплівки оптична густина розчину барвника з біоплівки не зменшувалася нижче $0,69 \pm 0,02$ од. Отже, під впливом бактеріофагу відбувається руйнування молоді 24 годинної біоплівки, проте більша частина її (біля 60 %) упродовж періоду 32 годин не піддається лізису.

За впливу бактеріофагу кількість мікробних клітин у біоплівці протягом 4-годинної взаємодії не зменшувалася, а навіть зростала в 1,8 раза (табл. 3.34).

Таблиця 3.34

Кількість *Staphylococcus aureus variant bovis* у 24-годинній біоплівці за дії бактеріофагу, $\bar{x} \pm SE$, n =8

Час впливу бактеріофагу, год [#]	Кількість життєздатних клітин у біоплівці, КУО/мл	Титр бактеріофагів, БУО/мл
0 (старт)	$1,5 \pm 0,1 \cdot 10^6$	$1,6 \pm 0,1 \cdot 10^6$
4	$2,7 \pm 0,2 \times 10^6$	$1,8 \pm 0,2 \times 10^6$
8	$3,2 \pm 0,3 \cdot 10^{5*}$	$1,9 \pm 0,2 \times 10^6$
12	$8,1 \pm 0,7 \cdot 10^{4*}$	$1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{7*}$
16	$4,3 \pm 0,4 \times 10^{4*}$	$2,7 \pm 0,3 \cdot 10^{5*}$
20	$2,3 \pm 0,2 \times 10^{4*}$	$1,9 \pm 0,2 \cdot 10^{9*}$
24	$1,9 \pm 0,1 \times 10^{3*}$	$1,6 \pm 0,1 \cdot 10^7$
28	$1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{3*}$	$4,8 \pm 0,5 \times 10^6$
32	$1,3 \pm 0,1 \cdot 10^{3*}$	$3,2 \pm 0,2 \cdot 10^{5*}$

Примітки: [#] - біоплівку вирощували протягом 24 годин, після чого вносили бактеріофаг; * - $p < 0,05$ порівняно з початковою кількістю

Через 8 годин їх кількість зменшилася в 4,7 раза ($p < 0,05$), порівняно з початковим вмістом. Практично з 8 години від початку контакту бактеріофагу з мікробними клітинами відбувся активний процес лізису стафілококів. На 24 годину від моменту інфікування бактеріальних клітин кількість стафілококів на 1 мл змиву з біоплівки становила $1,9 \pm 0,1 \times 10^3$ КУО/мл. Наступне продовження інкубації до 32 години суттєво не зменшило вмісту стафілококів у біоплівці.

Кількість бактеріофагів у біоплівці практично не змінювалася протягом 8 годин контакту з мікробними клітинами, однак відмічається тенденція до їх зростання. На 20 годину від моменту зараження стафілококів титр бактеріофагів зріс на три порядки і становив $1,9 \pm 0,2 \cdot 10^9$ БУО/мл. Зростання

кількості бактеріофагів у біоплівці співпадає з активним лізисом стафілококів, так як з 20 по 28 годину їх вміст найменший у біоплівці. Через 32 години впливу бактеріофагу на плівкоутворюючі стафілококи титр бактеріофагів становив $3,2 \pm 0,2 \times 10^5$ БУО/мл. Тобто, відмічаємо закономірність до поступового зменшення титру бактеріофагів у біоплівці, що пов'язано із значним лізисом стафілококів. Таким чином, за впливу бактеріофагу на молоді 24-годинні біоплівки *S. aureus var. bovis* повного лізису мікробних клітин упродовж 32 год контакту з вірусом не відбувається.

Період часу, протягом якого відбулося незначне зростання (на $4,6 \pm 0,2$ %) оптичної густини барвника з біоплівки становив 8 год (рис. 3.17).

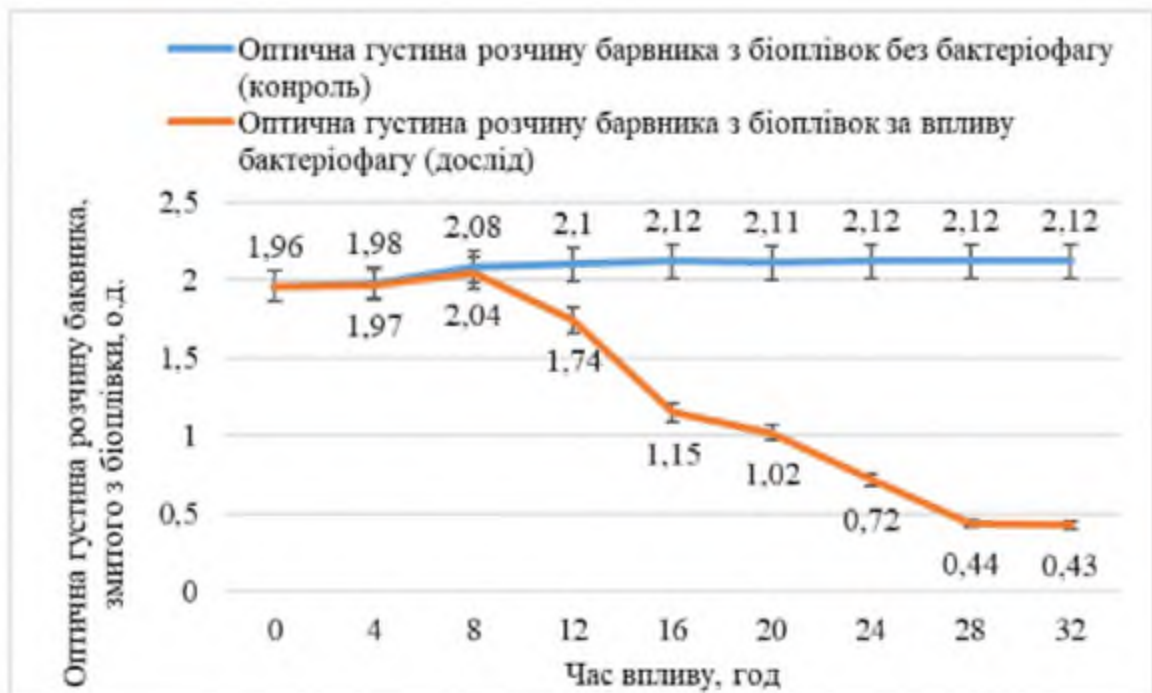


Рис. 3.17. Вплив бактеріофагу на 72-годинну біоплівку *Staphylococcus aureus variant bovis*, дані представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення

На 12 годину взаємодії бактеріофагу з мікробною клітиною виявили зменшення оптичної густини барвника на $22,0 \pm 1,3$ %, порівняно з біоплівкою, яка вирощувалася без бактеріофагу та на $11,2 \pm 0,3$ % порівняно з початковою густиною. Упродовж наступних годин впливу бактеріофагу відбулося

руйнування 77,5±1,4 % біоплівки і на 28 годину густина змитого барвника становила 0,44±0,02 од. За впливу бактеріофагу на зрілі 72-годинні біоплівки їх деградація відбувається інтенсивніше, порівняно з молодими 24-годинними біоплівками – кількість зруйнованої біоплівки виявилася, в середньому, в 2 рази ($p<0,05$) більша.

Протягом 4-ох годин взаємодії бактеріофагу і клітин стафілоkokів у біоплівці зміни кількості бактерій не відбувалося, а кількість бактеріофагів зросла на два порядки (табл. 3.35).

Таблиця 3.35

Кількість *Staphylococcus aureus variant bovis* у 72-годинній біоплівці за дії бактеріофагу, $\bar{x} \pm SE$, $n = 8$

Час впливу бактеріофагу, год [#]	Кількість життєздатних клітин у біоплівці, КУО/мл	Титр бактеріофагів, БУО/мл
0 (старт)	$9,3 \pm 0,9 \cdot 10^7$	$1,6 \pm 0,1 \cdot 10^6$
4	$9,4 \pm 0,9 \cdot 10^7$	$1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{8*}$
8	$5,2 \pm 0,5 \cdot 10^{6*}$	$1,1 \pm 0,2 \cdot 10^{9*}$
12	$6,7 \pm 0,7 \cdot 10^{3*}$	$2,4 \pm 0,2 \cdot 10^{8*}$
16	$4,4 \pm 0,4 \cdot 10^{3*}$	$3,7 \pm 0,4 \cdot 10^{7*}$
20	$9,1 \pm 0,9 \cdot 10^{2*}$	$2,1 \pm 0,2 \cdot 10^{7*}$
24	$2,2 \pm 0,2 \cdot 10^{2*}$	$1,8 \pm 0,2 \cdot 10^6$
28	$1,0 \pm 0,1 \cdot 10^{2*}$	$3,5 \pm 0,4 \cdot 10^{3*}$
32	0	10^{1*}

Примітки: [#] - біоплівку вирощували протягом 72 годин, після чого вносили бактеріофаг, * - $p<0,05$ порівняно з початковою кількістю

Через 8 годин контакту вірусу і бактерій розпочався процес лізису мікробних клітин і їх кількість зменшилась на один порядок, а кількість бактеріофагів зросла до $1,1 \pm 0,2 \cdot 10^9$ БУО/мл. На 12 годину впливу бактеріофагу процес відмирання стафілоkokів у біоплівці продовжувався, водночас вміст бактеріофагів перестав зростати і їх кількість становила $2,4 \pm 0,2$

$\cdot 10^8$ БУО/мл. Протягом наступних годин взаємодії бактеріофагів зі стафілококами у біоплівці продовжувалась фармакологічно-літична дія бактеріофагів і через 32 години від початку контакту фагу з біоплівкою бактеріальні клітини не виділялися.

Отже, за впливу стафілококового бактеріофагу на молоді 24-годинні біоплівки *S. aureus var. bovis* відмічали зменшення оптичної густини розчину барвника на $34,5 \pm 0,7$ % через 32 години за температури 37°C , порівняно з початковою густиною. Також відбувалося зменшення кількості клітин *S. aureus* у біоплівці з $1,5 \pm 0,3 \cdot 10^6$ до $1,3 \pm 0,2 \cdot 10^5$ КУО/мл змиву на 32 год дослідю. Це вказує на те, що мікробні клітини молодих біоплівок не піддаються повному лізису за дії навіть специфічного бактеріофагу. Водночас, за впливу бактеріофагу на зрілі 72-годинні біоплівки спостерігали деградацію $77,5 \pm 1,4$ % біоплівки на 32 годину за температури 37°C . При цьому з біоплівки не виділяли життєздатних клітин *S. aureus*.

Отримані результати свідчать про високу літичну активність бактеріофагу відносно зрілих біоплівкових бактерій та можливість його застосування при хронічних стафілококових інфекціях, спричинених *S. aureus var. bovis*.

Результати роботи, які описані в даному підрозділі висвітлено в науковій праці:

Horiuk Y.V., Kukhtyn M.D., Stravskyy Y.S., Klymnyuk S.I., Vergeles K.M., Horiuk V.V. Influence of staphylococcal *Phage SAvB14* on biofilms, formed by *Staphylococcus aureus variant bovis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2019. Vol. 10(3). P. 314–318. Doi: <https://doi.org/10.15421/021948> [299]

3.2.8. Антимікробна дія бактеріофагу *Phage SAvB14* на біоплівки, сформовані *Staphylococcus aureus variant bovis* в комплексі з антибіотиками

Біоплівки є найпоширенішим способом життя бактерій у природному і штучному середовищі [199]. Тому як результат, ефективна антибактеріальна терапія має бути направлена на видалення біоплівок. Механізми опору, які притаманні способу життя бактерій в біоплівці дуже різноманітні і включають інтерференцію позаклітинного матриксу з антимікробними агентами. З одного боку, матриця створює фізичний бар'єр для дифузії речовин, з іншого, хімічні взаємодії між матричними полімерами і антимікробними речовинами перешкоджають антибактеріальній активності [268, 425]. Тому дуже важливою характеристикою протимікробного засобу є його здатність проникати в біоплівку і досягати цільових бактерій. Численні дослідження продемонстрували, що бактеріофаги здатні знищувати біоплівки в лабораторних умовах [40, 493]. Проте, цілком ймовірно, що природні біоплівки можуть частково бути стійкими до фагів, що приведе до неповної елімінації фагочутливих бактерій. Тому для посилення ефекту фаготерапії ми оцінювали комбінований вплив на стафілококові біоплівки бактеріофагу в поєднанні з різними антибіотиками. Очікуваною перевагою такого підходу може бути сильніше пригнічення росту бактерій та знижена бактеріальна здатність до розвитку резистентності до фагів або антибіотиків.

Нами було досліджено вплив бактеріофагу *Phage SAvB14* на мікробні біоплівки *Staphylococcus aureus var. bovis* як окремо, так і в комплексі з антибіотиками. Для цього використовували 24-годинні біоплівки *Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f.*, які вирощували в одноразових пластикових чашках Петрі. Ефект комбінованого застосування фагу з антибіотиками оцінювали при одночасному та поетапному внесенні антибіотиків та бактеріофагу. При визначенні дії антибіотику та бактеріофагу *Phage SAvB14* за одночасного застосування на відміту 24-годину біоплівку вносили 1 мл суспензії *Phage SAvB14* з титром 10^5 БУО/мл і 1 мл антибіотику

з відповідними концентраціями. Результати оцінювали через 24 години. Відмивання біоплівки від залишків антибіотиків та фагів проводили тричі стерильним фосфатним буфером, після чого вносили 5 см³ стерильного 0,5 % розчину натрію хлориду і стерильним тампоном ретельно відмивали зі стінок і дна чашки мікробну біоплівку. Із чашок відбирали 1,0 см³ суспензії, готували ряд десятикратних розведень, проводили посів 1,0 см³ кожного розведення у чашки Петрі, заливали м'ясопептонним агаром та інкубували за температури 37 °С упродовж 24 – 48 годин. Контролем служили 24-годинні біоплівки, які піддавалися впливу ізотонічного розчину NaCl протягом 24 годин. Для визначення дії антибіотику та бактеріофагу *Phage SAyB14* за поетапного застосування на відміту 24-годину біоплівку впливали бактеріофагом (10⁵ БУО/мл) протягом 12 годин, наступні 12 годин діяли антибіотиком. Відмивання біоплівки від залишків антибіотиків та фагів проводили стерильним фосфатним буфером. Подальші процедури з визначення кількості стафілококів проводили як у попередньому досліді за одночасного застосування фагу і антибіотика. При визначенні дії антибіотику на клітини стафілококу у біоплівці для цього впливали на неї певними концентраціями біоциду. Відмивання біоплівки від залишків антибіотиків проводили стерильним фосфатним буфером. Визначення кількості життєздатних клітин стафілококів у біоплівці проводили аналогічно як у попередніх дослідях. Контролем служили 24-годинні біоплівки, які піддавалися впливу 0,5 % розчину NaCl протягом 24 годин. Титр бактеріофагів визначали за методом Грація [580] у рідині (суміш бактеріофагу та антибіотику) після її видалення з чашки Петрі через 24 години впливу на біоплівки. Нейтралізацію антибіотиків проводили стандартними методами. Контролем служив титр бактеріофагу у рідині без антибіотиків після 24 годин дії *Phage SAyB14* на біоплівку.

Спираючись на результати власних досліджень та повідомлення інших дослідників встановлено, що найчастіше для лікування маститів у корів використовують препарати на основі аміноглікозидів, тетрациклінів, цефалоспоринів та фторхінолонів. Для проведення дослідів було відібрано

чотири антибіотики: гентаміцин, тетрациклін, енрофлоксацин та цефтріаксон. Ці антибіотики були обрані залежно від механізму їх дії: інгібітор синтезу білка (гентаміцин, тетрациклін), інгібітор синтезу ДНК (енрофлоксацин) та інгібітор синтезу клітинної стінки (цефтріаксон). Попередніми дослідженнями встановлено, що через 8 годин контакту вірусу і стафілококів розпочався процес лізису мікробних клітин – їх кількість зменшувалася на один порядок, а через 32 години від початку контакту фагу з біоплівкою бактеріальні клітини не виділялися.

У цьому дослідженні ми визначили кількість життєздатних бактерій у 24-годинній біоплівці *S. aureus var. bovis* до і після 24 годин впливу на неї бактеріофагом *Phage SAvB14*, антибіотиками та їх різними комбінаціями. При визначенні кількості бактерій *S. aureus* у біоплівці за впливу на неї *Phage SAvB14* в комплексі з гентаміцином (Рис. 3.18) встановлено, що *Phage SAvB14* впливав на стафілококові біоплівки, так як кількість життєздатних клітин зменшилася в 7,94 раза ($p < 0,05$), порівнюючи з контролем дією на біоплівку ізотонічного розчину NaCl. За цих же умов при дії на біоплівку тільки гентаміцину кількість стафілококів зменшилася у 3,98 раза ($p < 0,05$), порівнюючи з контролем. Однак, кращий антибіоплівковий ефект отримали при застосуванні фагу в комплексі з антибіотиком. При одночасному додаванні антибактеріальних речовин спостерігали синергічну взаємодію, яка проявлялася у зменшенні кількості бактерій у 39,81 раза ($p < 0,05$), порівняно із застосуванням *Phage SAvB14* та у 79,44 раза ($p < 0,05$) порівняно з гентаміцином. За поетапного впливу спочатку бактеріофагу, а потім антибіотику біоплівка була зруйнована майже на 100 %, а кількість бактерій зменшилася в середньому в 25,05 разів ($p < 0,05$), порівнюючи з одночасною дією фагу і антибіотику.

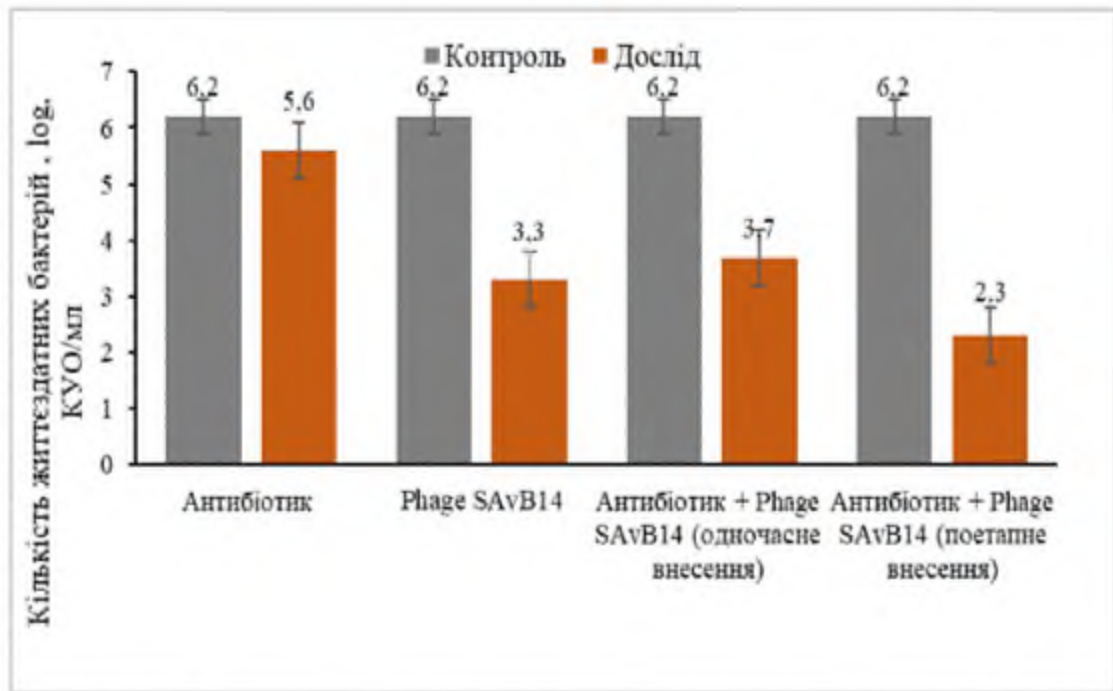


Рис. 3.18. Вплив на біоплівки *S. aureus var. bovis* бактеріофагу *Phage SAvB14* в комплексі з гентаміцином, $n = 3$: контроль – дія на біоплівку стерильного ізотонічного розчину NaCl; дослід – дія на біоплівку антибіотику, антибіотику та бактеріофагу *Phage SAvB14* при одночасному внесенні, антибіотику та бактеріофагу *Phage SAvB14* при поетапному внесенні

Результати визначення впливу на стафілококові біоплівки бактеріофагу *Phage SAvB14* в комплексі з тетрацикліном (Рис. 3.19) виявили, що бактерицидна дія при взаємодії фагу з тетрацикліном була слабшою, порівнюючи з гентаміцином. Так, одночасне застосування фагу і тетрацикліну не викликало синергічного ефекту відносно стафілококів у біоплівці, їх кількість становила, майже як і за впливу самого бактеріофагу. Водночас при поетапному внесенні фагу та антибіотику спостерігали більш виражений бактерицидний ефект – кількість бактерій була у 6,31 раза ($p < 0,05$) меншою, ніж за одночасного застосування.

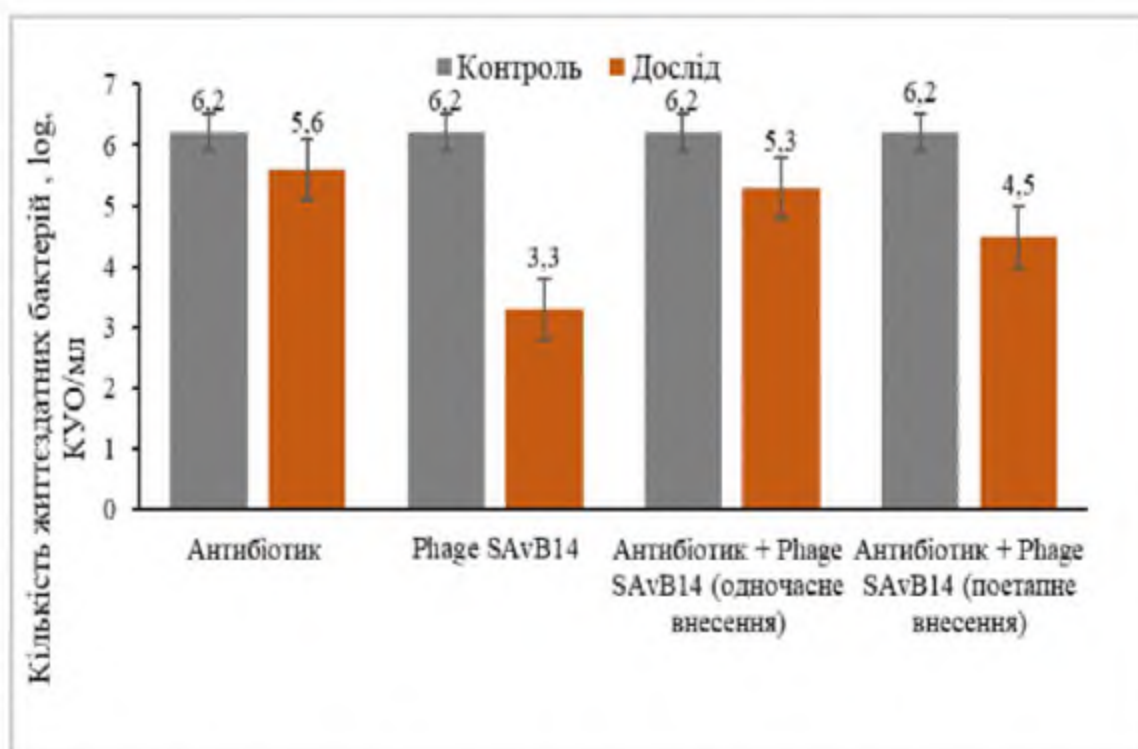


Рис. 3.19. Вплив на біоплівки *S. aureus var. bovis* бактеріофагу *Phage SAVB14* в комплексі з тетрацикліном, $n = 3$: контроль – дія на біоплівку стерильного ізотонічного розчину NaCl; дослід – дія на біоплівку антибіотику, антибіотику та бактеріофагу *Phage SAVB14* при одночасному внесенні, антибіотику та бактеріофагу *Phage SAVB14* при поетапному внесенні

Представник фторхінолонів – енрофлоксацин також не посилював синергічну антимікробну дію при взаємодії з фагом *Phage SAVB14* за одночасного застосування (Рис. 3.20), кількість клітин у біоплівці була як за впливу фагу чи антибіотика. Проте, за поетапного застосування фагу і енрофлоксацину спостерігали більшу загибель клітин стафілококів, їх кількість зменшилася в середньому в 50,12 рази ($p < 0,05$) і становила 3,7 lg КУО/мл змиву.

Подібну тенденцію відмічали і при дослідженні взаємодії *Phage SAVB14* з цефтріаксоном (Рис. 3.21).

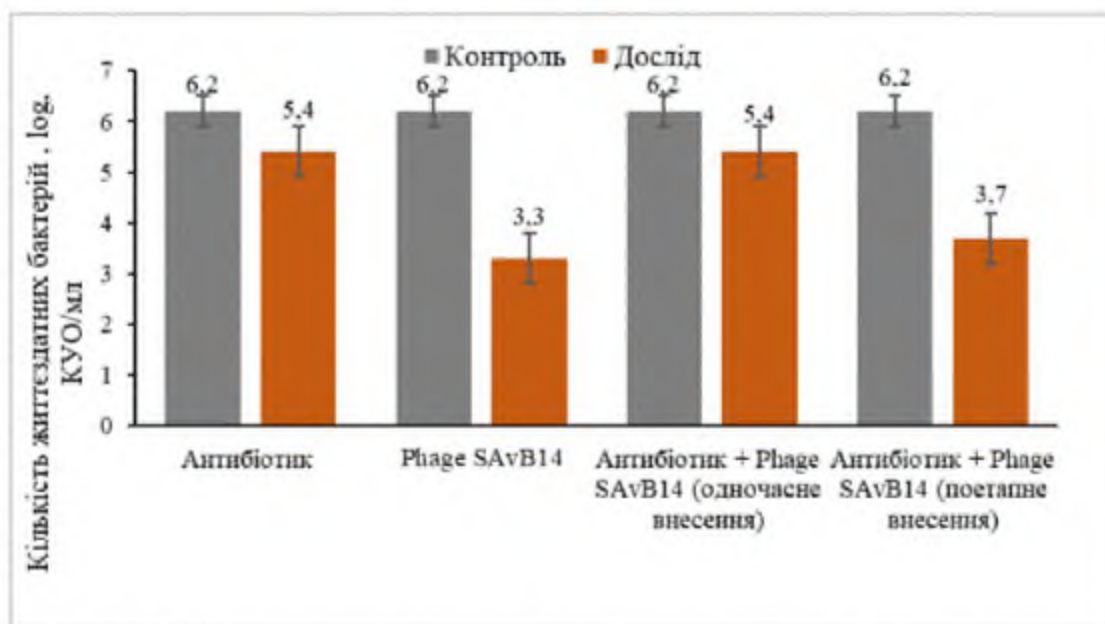


Рис. 3.20. Вплив на біоплівки *S. aureus var. bovis* бактеріофагу *Phage SAVB14* в комплексі з енрофлоксацином, $n = 3$: контроль – дія на біоплівку стерильного ізотонічного розчину NaCl; дослід – дія на біоплівку антибіотику, антибіотику та бактеріофагу *Phage SAVB14* при одночасному внесенні, антибіотику та бактеріофагу *Phage SAVB14* при поетапному внесенні

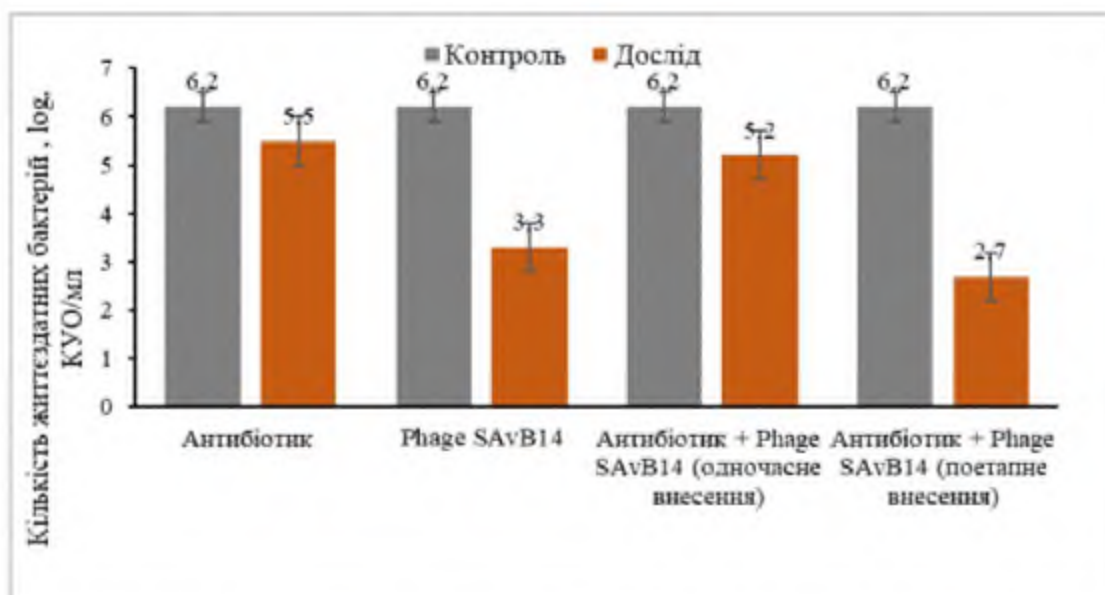


Рис. 3.21. Вплив на біоплівки *S. aureus var. bovis* бактеріофагу *Phage SAVB14* в комплексі з цефтріаксоном, $n = 3$: контроль – дія на біоплівку стерильного ізотонічного розчину NaCl; дослід – дія на біоплівку антибіотику, антибіотику та бактеріофагу *Phage SAVB14* при одночасному внесенні, антибіотику та бактеріофагу *Phage SAVB14* при поетапному внесенні

З даних рис. 3.21 видно, що тільки за поетапного застосування фагу і цефтріаксону спостерігали суттєве зменшення клітин стафілококів у біоплівці до $2,7 \text{ Ig КУО/мл}$, що в середньому $316,34$ рази ($p < 0,05$) менше, ніж за одночасного застосування фагу з антибіотиком. Інші варіанти знищення бактерій у біоплівці були менш ефективними.

Титр бактеріофагу *Phage SAvB14* також зазнавав змін при застосуванні його з різними комбінаціями антибіотиків (Рис. 3.22).

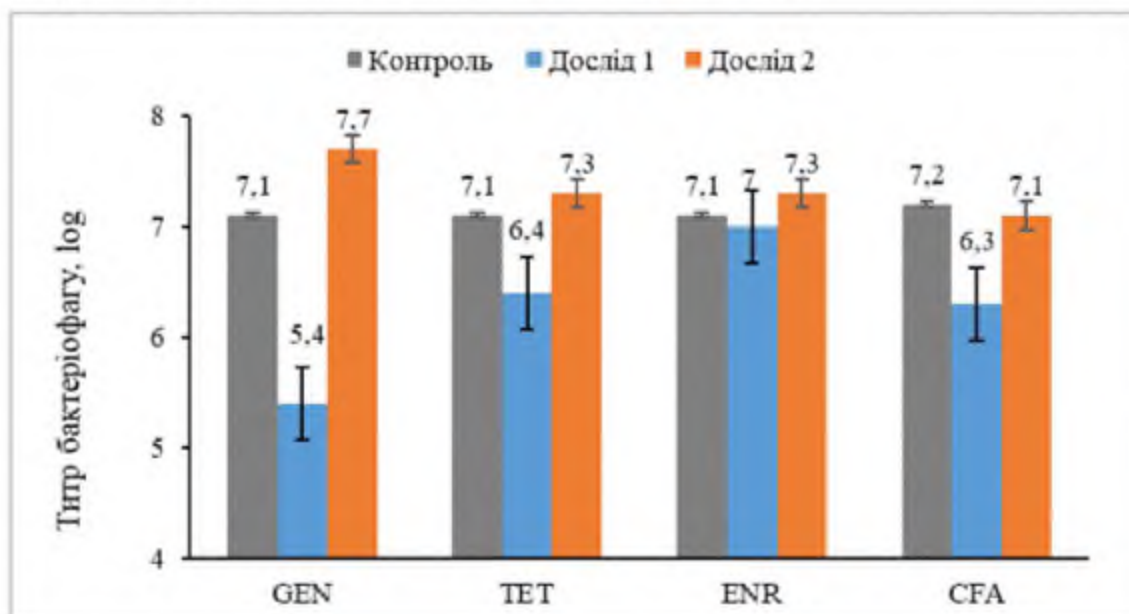


Рис. 3.22. Титр бактеріофагу *Phage SAvB14* за впливу на біоплівки *Staphylococcus aureus var. bovis* окремо та в комплексі з антибіотиками (GEN – гентаміцин, TET – тетрациклін, ENR – енрофлоксацин, CFA – цефтріаксон), $n = 3$: контроль – титр бактеріофагу після 24 годин дії на біоплівку, дослід 1 – титр бактеріофагу після 24 год дії на біоплівку при одночасному внесенні GEN, TET, ENR та CFA, дослід 2 – титр бактеріофагу після 24 год дії на біоплівку при поетапному внесенні GEN, TET, ENR та CFA

Зокрема, при поетапному застосуванні бактеріофагів та антибіотиків, титр фагів був, в середньому, у $8,45$ рази ($p < 0,05$) вищим, ніж при одночасному застосуванні та складав $7,1 - 7,7 \text{ Ig БУО/мл}$ (дослід 2). Водночас, найнижчий титр спостерігали при одночасному застосуванні фагу з антибіотиком гентаміцином – $\text{Ig } 5,4 \text{ БУО/мл}$ (дослід 1). При одночасному застосуванні фагу

з іншими антибіотиками (тетрацикліну, енрофлосацину та цефтріаксону) він був вищим у 7,91 – 398,10 разів ($p < 0,05$), порівняно з гентаміцином.

Отримані нами результати показали, що для знищення біоплівки *S. aureus var. bovis* можна використовувати *Phage SAvB14* як самостійний антибактеріальний агент, так і в комплексі з антибіотиками. Однак, при застосуванні в комплексі з антибіотиком доцільне введення фагу, а потім через певний час антибіотику.

Результати роботи, які описані в даному підрозділі висвітлено в науковій праці:

Horiuk Y.V., Kukhtyn M.D., Horiuk V.V., Sytnik V.A., Dashkovskyy O.O. Effect of *Phage SAvB14* combined with antibiotics on *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2021. Vol. 12(3). P. 531–536. Doi: <https://doi.org/10.15421/022173> [205].

3.3. Доклінічні дослідження новоствореного препарату Фагомаст на токсичність

В завдання цього розділу входило розробка препарату на основі бактеріофагу для лікування корів за стафілококового маститу, який не має токсичної дії в умовах *in vivo*, сприяє нормалізації загального стану організму та біохімічних показників крові корів, хворих маститом, шляхом знищення етіологічного чинника (збудника – золотистого стафілококу) та не впливає на здорових тварин.

3.3.1. Технологічні параметри виготовлення і контролю препарату на основі бактеріофагів для профілактики та лікування корів за маститу

Після вивчення основних біологічних властивостей виділених нами бактеріофагів для створення інтрацистерального препарату було обрано штам *Phage SAvB14*. Даний штам виділено із зразка секрету молочної залози ВРХ, хворої субклінічною формою маститу. Бактеріофаг *Phage SAvB_14* проявляє високу літичну активність щодо *Staphylococcus aureus var. bovis* та характеризується наступними властивостями: на газоні чутливого

бактеріального штаму *Staphylococcus aureus var. bovis* бактеріофаг *Phage SAvB 14* утворює прозорі з чіткими краями бляшки розміром 1-2 мм, вторинний ріст відсутній. Латентний період: 20 – 30 хвилин, *Phage SAvB14* більш стійкіший до впливів високих температур, коливання рН та хлороформу, порівняно з іншими дослідженими фагами. Найбільш оптимальними умовами для зберігання фагу *Phage SAvB14* визначено температурний режим в межах 4 та 8 °С. Штам бактеріофага *Phage SAvB 14* первинно задекларований в колекції мікроорганізмів Національного центру штамів мікроорганізмів України під номером 737 (Свідчення на штам від 05.03.2019) (Додаток Б) і на території України даного штаму до сьогодні ідентифіковано не було.

Отже, даний штам бактеріофага може бути використаний як перспективний при розробленні препаратів для профілактики та лікування корів за стафілококового маститу.

Перший етап технології виробництва це нарощування фагів. Нарощування високих титрів фагів проводили наступним чином. В колби з живильним середовищем (50 мл) вносили 0,5 мл тест-культури з концентрацією мікроорганізмів 10^9 КУО/мл та проводили інкубування протягом 2-3 годни за температури 37 °С. Потім додавали фаг із різною кількістю фагових віріонів. Продовжували культивувати за тих самих умов майже до повного прояснення фаголізату (18-20 год). Отриманий фаголізат центрифугували при 6000 об/хв., потім фільтрували, використовуючи фільтри з діаметром пор 0,45 та 0,22 мкм. У стерильному фаголізаті визначали титр фагів за методом Грація.

Другий етап технології виробництва це очищення фагів. Очищення фагових лізатів проводили методом мембранної ультрафільтрації [563]. В очищених препаратах концентрації загального білка та ліпополісахаридів становили 10 ± 2 мкг/мл та 5 ± 1 мкг/мл відповідно. У кожному з отриманих зразків концентрація фагових частинок варіювала в межах 10^{-7} – 10^{-9} БУО/мл.

Третій етап технології виробництва змінювання отриманого фаголізату із гелеподібними і стабілізуючими речовинами. Очищений фаговий лізат змішували з карбополем у відповідних концентраціях для утворення гелеподібної речовини, що більш рівномірно буде розподілятися у молочній залозі.

В результаті проведених досліджень отримано дослідний зразок препарату Фагомаст, який у своєму складі містить вірулентні бактеріофаги *Phage SAyB14* з титром $10^7 - 10^9$ БУО/мл, які проявляють літичну дію щодо *Staphylococcus aureus variant bovis*. Препарат фасували у шприци по 10 мл для індивідуального використання та зберігали в холодильнику.

Стабільність готового фагового препарату перевіряли за методом «прискореного старіння». Для цього ми відбирали по три шприци та поміщали у термостат за температури $+40\text{ }^\circ\text{C}$. Негативним контролем служили зразки препарату, які зберігали за температури холодильника (від $+2$ до $-8\text{ }^\circ\text{C}$). Препарат вважали непридатним до використання при зниженні титру до 10^4 БУО/мл.

Термін зберігання вираховували за формулою:

$$C = K \cdot C_0 \quad (3.1)$$

де: C – термін придатності при температурі зберігання (t_{op}), пов'язаний з експериментальним терміном придатності (C_0 при підвищеній температурі експериментального зберігання (t_c) через коефіцієнт відповідності K .

Коефіцієнт відповідності для всіх бактеріофагових препаратів складає 18,8 [458].

Результати дослідження з визначення стабільності готового фагового препарату представлені в табл. 3.36.

З даних, представлених в табл. 3.36 видно, що бактеріофаги у дослідних зразках препарату Фагомаст з різними титрами інактивуються в експериментальних умовах майже з однаковою швидкістю, за температури $+40\text{ }^\circ\text{C}$ їх активність знижується до 10^4 БУО/мл. При цьому титр фагів

залишався стабільним у контрольних зразках протягом всього періоду випробування.

Таблиця 3.36

Експериментальні терміни зберігання готового препарату Фагомаст

Штам фагу	Коефіцієнт відповідності, K	Початковий титр фагу, БУО/мл	Титр на C_0 , БУО/мл	Термін експериментального зберігання, C_0 , діб	Термін зберігання, C , діб
<i>Phage SAxB14</i>	18,8	$1,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^4$	20	376
		$1,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^4$	21	394,8
		$1,3 \times 10^9$	$1,6 \times 10^4$	21	394,8

Отже, отримані дані дають підстави вважати, що термін придатності препарату Фагомаст може складати до 394,8 діб за умови холодильного зберігання (+2 - -6 °C). Крім того, такий великий термін дозволяє не вносити консерванти у препарат.

Паралельно також проводили дослідження з визначення активності (титру) бактеріофагів у препараті, визначали рівень концентрації водневих іонів та стерильність протягом 12 місяців (табл. 3.37).

Таблиця 3.37

Стабільність дослідного зразка препарату Фагомаст

Показник	Терміни зберігання, діб						
	30	60	120	180	240	300	360
Титр бактеріофагу*	не менше 10^7	не менше 10^7	не менше 10^7	не менше 10^7	не менше 10^7	не менше 10^7	не менше 10^7
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,1	7,1
Стерильність	-	-	+	+	-	+	+

Примітки: * - вказано найнижчий титр у всіх дослідних зразках; «+» - стерильно.

Отже, результати дослідження вказують на те, що протягом 12 місяців зберігання дослідного зразка препарату Фагомаст за температури від -2 до +6 °C не відбулося зниження титру бактеріофагів нижче 10^7 БУО/мл. Рівень

pH був в межах норми та майже не змінився до кінця експерименту. Протягом всього дослідного періоду препарат залишався стерильним.

3.3.2. Токсикологічна оцінка препарату Фагомаст для лікування корів за маститу

Сучасні технології виготовлення фагових препаратів передбачають високий ступінь очищення від продуктів життєдіяльності бактерій, ендо- та екзотоксинів, продуктів фаголізу бактеріальних клітин. Однак, препарати бактеріофагів необхідно досліджувати на відповідність вимог безпеки і відсутність бактеріальних чи інших токсичних забруднень. Однією з вимог до антибактеріального препарату, що виводиться на ринок, є підтвердження його безпеки [86, 251]. Незважаючи на те, що бактеріофаги успішно використовуються в світовій лікувальній практиці, в Україні недостатньо чинних нормативних документів для оцінки токсичності препаратів бактеріофагів. У цьому дослідженні ми визначити гостру та хронічну токсичність препарату на основі бактеріофагів Фагомаст для лікування маститу корів. При постановці дослідів керувалися вимогами ГОСТ 12.1.007-76 «Шкідливі речовини. Класифікація та загальні вимоги нешкідливості», принципами OECD «Керівні принципи щодо гострої токсичності хімічних речовин» та стандартами GLP (Належна лабораторна практика).

Оцінка токсичності *in vivo*, а саме визначення гострої токсичності при одноразовому введенні та багаторазове застосування препарату мала на меті визначити потенційний розвиток індукованих бактеріофагами токсичних ефектів на живих організмах. Нами проведено визначення гострої та хронічної токсичності препарату на основі бактеріофагів Фагомаст для лікування корів за маститу.

Результати дослідження гострої токсичності препарату Фагомаст, який вводили білим мишам у шлунок в дозах 2 000 та 5 000 мг/кг, не виявили ніяких ознак токсичності (табл. 3.38).

Смертність, клінічні ознаки та патзміни при дослідженні гострої токсичності препарату Фагомаст

Групи тварин	Клінічні ознаки та патзміни						Смертність
	Загальний стан	Серцево-судинна система	Дихальна система	Травна система	Нервова система	Сечовидільна система	
1-ша дослідна, n=6	Н	Н	Н	Н	Н	Н	0
2-га дослідна, n=6	Н	Н	Н	Н	Н	Н	0
Контрольна, n=6	Н	Н	Н	Н	Н	Н	0

Примітка: Н – не виявлено змін.

При вивченні властивостей препарату Фагомаст стосовно кумулятивної дії та за результатами спостережень за дослідними і контрольними тваринами упродовж усього терміну експерименту не було виявлено жодних відхилень в поведінці, фізіологічні функції залишалися в нормі. Загибелі тварин не було. При патологоанатомічних дослідженнях, проведених при розтині забитих мишей, видимих макроскопічних змін у внутрішніх органах, слизових та серозних покриттях не виявлено. Всі органи грудної та черевної порожнини мали правильне анатомічне розташування. Очеревина та костальна плевра були гладкими, без нашарувань, вологі, блискучі. Серце мало конусоподібну форму, перикард прозорий без нашарувань, міокард червоного кольору, консистенція пружна. Легені блідо-рожевого кольору, консистенція пухка, добре виражений поділ на окремі долі, плевра без крововиливів та нашарувань, стінки бронхів не потовщені. Селезінка не збільшена, краї гострі, темно-вишневого кольору, при розрізі структура збережена. Печінка не збільшена, краї гострі, капсула гладка, темно-червоного кольору, рівномірно кровонаповнена, консистенція пружна, на розрізі структура характерна. Нирки темно-червоного кольору, бобовидні, не збільшені, межі між кірковою і мозковою зонами збережені, капсула легко знімається. Шлунок частково заповнений кормовими масами, слизова оболонка блідо-рожева, рельєфна, волога, блискуча, без нашарувань. Тонкий кишечник заповнений кормовими

масами, товстий – сформованими каловими масами, слизові оболонки блідо-рожеві, блискучі, без нашарувань. Отже, препарат Фагомаст не володіє вираженою кумулятивною дією.

При вивченні подразнюючої дії препарату Фагомаст на шкіру дослідних тварин не виявлено будь-яких видимих змін на епідермісі. Крім того, розчини препарату Фагомаст не впливали на зміну поведінки тварин дослідної групи.

При вивченні сенсibilізуючої дії препарату Фагомаст з'ясовано, що в перші хвилини після аплікації препаратом тварини робили спробу його злизати, далі їх поведінка не відрізнялась від звичайної. На поверхні шкіри протягом 2-х годин не спостерігали змін. При дослідженні ділянок шкіри із аплікацією розчинами препарату Фагомаст будь-яких патологічних ознак не виявлено. За результатами досліджень було встановлено, що препарат Фагомаст не викликає подразнюючої і сенсibilізуючої дії.

При вивченні шкірно-резорбтивних властивостей препарату Фагомаст при його застосуванні ознак токсичності не виявлено, що засвідчували результати досліджень – всі миші залишалися живими зі збереженням апетиту і адекватності поведінки.

З даних, наведених в табл. 3.38 видно, що навіть максимальна доза препарату не викликала змін загального стану, роботи серцево-судинної, дихальної, травної, нервової та сечовидільної систем. Середня вага дослідних груп мишей, які отримували фаг та контрольної групи вірогідно не відрізнялася. За період дослідження тварини добре поїдали корм, не відмічалось ніяких фізіологічних відхилень. При патологоанатомічному розтині явних відмінностей між дослідними та контрольною групами не виявлено. Розміщення внутрішніх органів правильне. Очеревина гладка, блискуча, волога, без нашарувань. Серце конусоподібне, перикард прозорий, без нашарувань, міокард червоний, пружний. Легені блідо-рожеві, частково наповнені повітрям, пружні, плевра без нашарувань. Селезінка темно-вишнева, не збільшена, краї гострі, пружна, структура на розрізі не змінена. Печінка темно-коричнева, не збільшена, капсула гладка, рівномірно

кровонаповнена, структура на розрізі не змінена. Нирки темно-червоного кольору, бобовидні, не збільшені, межі між кірковою і мозковою зонами збережені, капсула легко знімається. Слизова оболонка шлунока та кишечника мишей, яким задавали Фагомаст, блідо-рожева, рельєфна, волога, блискуча, без нашарувань.

Результати токсичності препарату Фагомаст при багаторазовому введенні наведено в табл. 3.39.

Таблиця 3.39

Смертність, клінічні ознаки та патзміни при дослідженні токсичності препарату Фагомаст при багаторазовому введенні

Групи тварин	Клінічні ознаки та патзміни						Смертність
	Загальний стан	Серцево-судинна система	Дихальна система	Травна система	Нервова система	Сечовидільна система	
1-ша дослідна, n=6	Н	Н	Н	Н	Н	Н	0
2-га дослідна, n=6	Н	Н	Н	Н	Н	Н	0
Контрольна, n=6	Н	Н	Н	Н	Н	Н	0

Примітка: Н – не виявлено змін.

Дані, наведені в табл. 3.39 вказують на те, що введення препарату Фагомаст протягом 14 днів змін з боку серцево-судинної, дихальної, травної, сечовидільної систем не викликало. Результати клінічного спостереження було підтверджено результатами патрозтину.

Нами проведено вивчення морфологічних показників периферичної крові мишей після обробки препаратом Фагомаст, результати представлені в табл. 3.40.

Препарат Фагомаст не впливав на стан еритропоезу, так як після обробки тварин у білих мишей дослідної групи вміст гемоглобіну невірогідно збільшився на 5,9 % проти початкових даних при тому, що загальна кількість еритроцитів периферичної крові мишей була в межах фізіологічної норми до

та після завершення експерименту. Обробка лабораторних тварин препаратом Фагомаст, як показали дослідження, не чинила будь-якого впливу на лейкопоез, про що свідчать показники загальної кількості лейкоцитів в периферичній крові дослідних тварин на початку та впродовж усього експерименту.

Таблиця 3.40

Гематологічні показники периферичної крові мишей за обробки препаратом Фагомаст, %, $\bar{x} \pm SE$, n =12

Показники	Контрольні тварини	Дослідні тварини			
		Початкові дані	За обробки препаратом через:		
			3 год	7 діб	14 діб
Еритроцити, Т/л	9,5±0,1	8,6±0,3	8,3±0,6	9,1±0,4	9,3±0,5
Лейкоцити, г/л	9,4±0,1	9,5±0,2	10,1±0,3	9,9±0,1	9,4±0,2
Гемоглобін, г/л	95,1±1,3	97,1±3,1	103,1±2,1	105,1±1,2	102,1±1,2
Лейкограма:					
базофіли	1,0±0,1		1,0±0,4	1,0±0,1	
еозинофіли	3,0±0,1	4,0±0,1	5,1±0,2*	4,0±0,1	3,0±0,2
нейтрофіли:					
мієлоцити	–	–	–	–	–
юні	–	–	–	–	–
паличкоядерні	4,1±0,1	4,2±0,2	2,1±0,3	2,0±0,3	3,5±0,2
сегментоядерні	21,0±0,2	19,8±0,3	20,1±0,1	21,3±1,1	20,5±1,1
лімфоцити	72,0±1,5	69,0±1,7	80,0±1,3*	66,0±1,1	67,0±1,8
моноцити	3,0±0,1	3,0±0,2	4,0±0,4	4,0±0,3	3,5±0,2

Примітка: * – $p < 0,05$ – проти початкових даних.

Проведена диференціація лейкоцитів периферичної крові дослідних тварин, виражена у лейкограмі, показала, що тимчасові зміни морфологічного складу були відмічені через 3 год після обробки препаратом. Зокрема, в цей

період спостерігалася еозинофілія, яка характеризувалася вірогідним зростанням кількості еозинофілів ($p < 0,05$) щодо початкових даних. Проте, уже через 7 діб після обробки кількість еозинофілів в периферичній крові дослідної групи мишей була оптимізована до норми та залишалася такою до кінця терміну досліджень. Крім того, через 3 год після обробки білих мишей препаратом Фагомаст був також встановлений і лімфоцитоз так, як відносний вміст лімфоцитів вірогідно ($p < 0,05$) зростав на 18 % проти власних початкових даних. Слід відмітити, що лімфоцитоз був відносним з огляду на те, що загальна кількість лейкоцитів знаходилася в межах фізіологічної норми та через 7 діб після обробки відносний вміст лімфоцитів був оптимізований і залишався в межах норми до кінця терміну експерименту. Всі інші морфологічні показники периферичної крові у дослідних мишей знаходилися в межах фізіологічної норми упродовж усього терміну експерименту.

Таким чином, обробка тварин препаратом Фагомаст не впливає на загальний гемопоез та викликає незначну тимчасову еозинофілію та лімфоцитоз, які оптимізувалися до норми за 7 діб після застосування препарату.

Отже, за результатами досліджень з'ясовано, що гостра токсичність препарату Фагомаст відповідає LD_{50} – більше 5000 мг/кг живої маси тварин. Препарат не володіє кумулятивними властивостями. Препарат не викликає подразнення, не володіє сенсibiliзуючими властивостями та нетоксичний при пероральному попаданні в живий організм. При дослідженні крові морфологічні показники достовірно не змінювались. За встановленими ознаками робочі розчини препарату Фагомаст віднесено до IV класу (малотоксичні) щодо небезпечності.

Результати, які описанов даному підрозділі опубліковано в статті:

Horiuk Y., Kukhtyn M., Kovalenko V., Mizyk V. (2021). Toxicological evaluation of the drug "Fagomast" for the treatment of mastitis in cows. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 2021. Vol. 7. P. 29–34. Doi: <https://doi.org/10.31890/vttp.2021.07.04> [560]

3.3.3. Вплив препарату Фагомаст на життєздатність інфузорій та слизову оболонку очей кроликів

Лабораторні дослідження встановили, що препарат активно лізує клітини золотистого стафілококу: через 8 годин контакту вірусу і бактерій їх кількість зменшується на один порядок, а через 32 години від початку контакту фагу з біоплівкою бактеріальні клітини не виділяються. Тому наступною частиною досліджень мають бути експерименти, спрямовані на визначення токсичного впливу різних концентрацій препарату на клітини різних організмів.

Отримані дані токсикологічних досліджень дозволять проводити етап виробничих досліджень щодо лікування різних форм маститу та встановлення кратності його застосування.

На першому етапі дослідження було визначено рухову активність, зміни форми та наявність мертвих клітин інфузорій під час мікроскопії краплі, відібраної із проб препарату з різною кількістю фагових частинок, та порівняно з їх активністю у контрольному – пептонному середовищі. Результати дослідження наведено в табл. 3.41.

З даних табл. 3.41 видно, що за концентрації фагів від 10^1 до 10^9 БУО/мл у препараті зміни рухової активності та патологічних відхилень у клітинах інфузорій не відмічали. Тетрахімени були активними, їх рух характеризувався як прямолінійний та поступовий і не відрізнявся від руху інфузорій, наявних у контрольній пробі (пептонне середовище). При цьому, кількість мертвих клітин не відрізнялася у дослідних пробах і в обох контролях. Враховуючи дані характеристики за активністю і руховою діяльністю інфузорій, усі проби із вмістом бактеріофагів були оцінені як такі, що не чинять токсичного впливу на клітини тетрахімен.

**Активність клітин інфузорій *Tetrachymena pyriformis* за впливу
бактеріофагового препарату Фагомаст, $\bar{x} \pm SE$, n =8**

Концентрація препарату за кількістю фагів, БУО/мл	Характеристика життєздатності культур <i>Tetrachymena pyriformis</i> , бали				
	розмно- ження	активність та рухливість	неприродні рухи	зміна форми	мертві клітини
до 10^4	1	0	0	0	0
10^5	1	0	0	0	0
10^6	1	0	0	0	0
10^7	1	0	0	0	0
10^8	1	0	0	0	0
10^9	1	0	0	0	0
Контроль (допоміжні речовини)	1	0	0	0	0
Контроль (нейтронне середовище)	0	0	0	0	0

Примітки: "0" балів – "нетоксичне середовище" – зниження розмноження інфузорій до 20 % без порушення рухової активності;

"1" бал – "слабо токсичне середовище" – зниження розмноження на 25 – 30 % без порушення рухової активності;

"2" – бали – "помірно токсичне середовище" – зниження розмноження на 35 – 40 % з одночасним зменшенням рухової активності інфузорій, наявність до 10 % клітин із зміненними формами;

"3" – бали – "виражено токсичне середовище" – зниження інтенсивності розмноження на 50 % з одночасною наявністю до 20 % тетрахімен з порушенням рухової активності, зміни форми, наявністю мертвих клітин;

"4" – бали – "сильно токсичне середовище" – зниження інтенсивності розмноження інфузорій більше, як 50 % з одночасною наявністю значної кількості тетрахімен з порушенням рухової активності, зміни форми (наявність цист, деформацій клітин, коротких, довгих, з вигинаннями).

При цьому встановлено зниження розмноження клітин *Tetrachymena pyriformis* у всіх пробах препарату з різною кількістю фагів та контролі з вмістом допоміжних речовин, що входять у склад Фагомасту за 60 хв інкубації (результати табл. 3.42 та табл. 3.43). Дане явище ми пояснюємо низькою

поживною і біологічною цінністю препарату Фагомаст, адже при недостатній поживності середовища існування інфузорій, інтенсивність розмноження їх істотно знижується, про що повідомляється у нормативних документах. Результати дослідження кількісного вмісту інфузорій у дослідних пробах та в контролі наведено в табл. 3.42

Таблиця 3.42

Вплив бактеріофагового препарату Фагомаст на життєздатність лабораторно штаму інфузорії *Tetrachytena pyriformis*, $\bar{x} \pm SE$, n = 8

Концентрація препарату за кількістю фагів, БУО/мл	Кількість тетрахімен при мікроскопії (в полі зору), шт/ук, через		Міра токсичності середовища
	0,5 год	1 год	
до 10^4	30,4 \pm 1,3	30,9 \pm 1,2*	Нетоксичне
10^5	30,6 \pm 1,2	31,1 \pm 1,3*	Нетоксичне
10^6	30,2 \pm 1,1	30,9 \pm 1,1*	Нетоксичне
10^7	30,5 \pm 1,2	31,3 \pm 1,2*	Нетоксичне
10^8	30,8 \pm 1,2	31,5 \pm 1,1*	Нетоксичне
10^9	30,2 \pm 1,2	31,0 \pm 1,0*	Нетоксичне
Контроль (допоміжні речовини)	30,3 \pm 1,3	31,0 \pm 1,2*	Нетоксичне
Контроль (пептонне середовище)	34,2 \pm 1,4	39,7 \pm 1,6	Нетоксичне

Примітка. * $p < 0,05$ – порівняно з контролем (пептонне середовище)

З результатів табл. 3.42 видно, що протягом півгодинної інкубації тетрахімен їх кількість у всіх пробах із вмістом фагу становила, в середньому, 30,4 \pm 1,2 шт, у контрольному середовищі з пептоном кількість інфузорій збільшилася до 34,2 \pm 1,4 шт. Кількісні зміни інфузорій у контролі, який містив тільки допоміжні хімічні речовини, що входять у склад препарату Фагомаст, не відрізнялися від дослідних проб.

За одногодишньої експозиції тетрахімен у дослідних пробах їх кількість достовірно не збільшилася, порівнюючи з 30-хвилинною інкубацією і становила, в середньому, $31,1 \pm 1,3$ шт. У контрольному целтонному середовищі спостерігаємо збільшення кількості інфузорій приблизно на 21,7 % ($p < 0,05$) проти дослідних зразків із вмістом фагів від 10^4 до 10^9 БУО/мл. Даний процес, як було сказано, відбувається за рахунок відсутності живильних речовин у препараті Фагомаст.

Отже, підсумовуючи результати даного дослідження необхідно зазначити, що розроблений фаговий препарат Фагомаст для лікування маститу корів не спричиняє токсичного впливу на життєздатність культур інфузорій *Tetrachylena pyriformis* за умови наявності у його складі фагових частин до 10^9 БУО/мл.

Наступним етапом токсикологічних досліджень було визначити місцеву подразнюючу дію різних концентрацій препарату Фагомаст на слизових оболонках очей кролика. Адже лікувальний протимаститний препарат Фагомаст вводиться внутрішньоцистернально, тому проведення такого роду досліджень вважається обов'язковим, так як дозволяє встановити чи не буде препарат проявляти подразнюючої дії [143, 345]. Місцеву подразнюючу (шкідливу) дію препарату за різних концентрацій фагових частин досліджували на слизових оболонках очей кроликів. Результати дослідження наведено в табл. 3.43.

Таблиця 3.43

Оцінка шкідливої (подразнюючої) дії фагового препарату Фагомаст на слизові оболонки очей кролика, n =30

Реакція слизових оболонок ока	Критерії оцінки в балах	Кількість фагів БУО/мл	Кількість балів
А. Гіперемія кон'юнктиви та рогівки	1-3	$10^4 - 10^9$	0
Б. набряк повік	1-4		0
В. Виділення з ока	1-3		0

Протягом періоду тривалості експерименту видимих змін стану слизових оболонок не спостерігали, як за внесення препарату за кількості фагових частин 10^7 БУО/мл, так і за максимального вмісту 10^9 БУО/мл. Усі кролики після закапування Фагомасту відразу відкривали око та в подальшому були рухливі без зміни поведінки.

Отже, на підставі проведеного експерименту можемо стверджувати, що фаговий препарат Фагомаст для лікування маститу корів не спричиняє місцевої подразнюючої дії на слизову оболонку очей кролика за кількості фагових частинок від 10^7 до 10^9 БУО/мл.

Результати, які описанов даному підрозділі опубліковано в статті: **Горюк Ю.В., Кухтин М.Д., Горюк В.В., Мізик В.П.** Вплив препарату Фагомаст на життєдіяльність інфузорій та слизову оболонку очей кроликів. *Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка, Кам'янець-Подільський*, 2022. №35. С. 55-62. Doi: <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2021-2-7> [9].

3.4. Клінічні випробування новоствореного препарату Фагомаст і порівняльна характеристика з існуючими протимаститними препаратами

3.4.1. Фармакологічна ефективність застосування препарату Фагомаст залежно від вмісту діючої речовини

Фаготерапію поділяють на активну та пасивну. Пасивні методи фаготерапії забезпечують достатню кількість фагів для знищення цільових бактерій, тобто індуктивну щільність, щоб знищити більшість цих бактерій для контролю інфекції навіть при відсутності виробництва нових фагових віріонів *in situ* [37]. Активне лікування фагами, навпаки, явно передбачає виробництво нових віріонів *in situ* [402]. Для того, щоб активне лікування було успішним, має бути присутня достатня кількість бактерій, які здатні підтримувати великі розміри фагових вибухів для досягнення залишкової щільності фагів [433]. Проте, перешкодами активного типу може бути те, що бактерії, які існують в природному середовищі, можуть бути менш

фізіологічно активними та можуть не підтримувати ті розміри фагових вибухів, які є в лабораторних умовах [440]. Також зміни у фізіології бактерій або зміни в експресії бактеріальних генів у відповідь на вплив зовнішніх факторів можуть зменшувати кількість молекул рецепторів на поверхні бактеріальної клітини, необхідних для адсорбції фагів [284]. Крім того, не всі бактеріальні штами здатні підтримувати великі розміри вибуху або швидку адсорбцію віріонів. Таким чином, навіть з врахуванням достатньої щільності фагів *in vitro*, все ще може бути важко досягнути адекватного рівня зростання популяції фагів, що призведе до успішного активного лікування *in vivo*. При пасивному лікуванні здатність виробляти нові фагові віріони під час знищення цільових бактерій також є корисною характеристикою, хоча б заради консервативності з точки зору максимального збільшення кількості фагів, і негативного впливу їх на бактерії [37, 433].

Під час розроблення фагового препарату необхідно розрахувати таку дозу кількості фагу у засобі, яка буде ефективною навіть при пасивному фаговому лікуванні. Тому для вивчення терапевтичної ефективності застосування бактеріофагових препаратів необхідно визначити оптимальні умови та бактерицидну концентрацію фагів, яка необхідна для знищення бактерій.

Для визначення оптимальної терапевтичної дози препарату на основі бактеріофагів Фагомаст в лабораторних умовах нами розроблено дослідні зразки з різними титрами бактеріофагу *Phage SAvB14*, літичного щодо *Staphylococcus aureus var. bovis*: 10^7 , 10^8 та 10^9 БУО/мл. Препарат фасували у шприци по 10 мл для індивідуального використання та зберігали в холодильнику. Стерильність препаратів кожної партії перевіряли шляхом інокуляції 1 мл в 5 мл стерильного м'ясопептонного бульйону, який інкубували при температурі 37 °C та спостерігали за помутнінням бульйону протягом 48 годин, після чого проводили відсів на чашки Петрі з м'ясопептонним агаром. Крім того, з кожної партії залишали один шприц,

який після завершення дослідів повертали до лабораторії для підтвердження концентрації фагів.

Для дослідження з визначення оптимальної терапевтичної дози бактеріофагового препарату Фагомаст *in vivo* було сформовано чотири групи тварин за принципом аналогів (одна контрольна та три дослідних). Перед постановкою дослідів тварин обстежували на наявність субклінічного маститу за допомогою 2 % мастидину та проводили посів секрету молочної залози для виявлення та ідентифікації збудника. Тварин вважали хворими субклінічною формою стафілококового маститу, коли реакція з мастидином була оцінена у «-+-» і «-++» та виділявся золотистий стафілокок в кількості більше 1000 КУО/мл. Контролем були тварини, яким для лікування застосовували препарат на основі антибіотиків згідно інструкції з його використання.

Коровам першої дослідної групи застосовували зразки препарату з титром *Phage SAvB14* 10^{-7} БУО/мл, другій дослідній групі з титром 10^{-8} БУО/мл та третій групі 10^{-9} БУО/мл (табл. 3.44).

Таблиця 3.44

**Схема проведення досліджень для визначення оптимального титру
Phage SAvB14 у препараті Фагомаст**

Групи тварин	Титр <i>Phage SAvB14</i> у дослідному зразку препарату, БУО/мл	Схема лікування
Контрольна	Застосовували препарат на основі антибіотиків згідно інструкції з його використання	
Перша	10^{-7}	Препарат вводили в дозі 10 мл, через кожні 12 годин
Друга	10^{-8}	Препарат вводили в дозі 10 мл, через кожні 12 годин
Третя	10^{-9}	Препарат вводили в дозі 10 мл, через кожні 12 годин

Схема лікування корів дослідних груп включала інфузію 10 мл препарату, який вводили після здоювання двічі на добу. До доїння дійки обробляли за звичайною процедурою, яка використовується на фермі. Після доїння дійки корів, взятих в дослід, обробляли 70 % спиртом та вводили дослідний препарат. Після інфузії молочну залозу масажували поступальними рухами вгору для кращого розподілення діючої речовини в залозі.

Асептично зразки секрету корів відбирали з кожної чверті вимені для визначення титру фагу та вмісту стафілококів перед кожним наступним введенням препарату (через кожні 12 годин). Тварин вважали здоровими коли з чвертей вимені не виділяли золотистий стафілокок та реакція з мастидином оцінювалася як негативна.

При визначенні оптимальної кількості фагових частинок *in vivo* нами розроблено три партії препарату Фагомаст з титрами 10^{-7} , 10^{-8} та 10^{-9} БУО/мл, ефективність застосування яких наведена в табл. 3.45.

Таблиця 3.45

Ефективність застосування дослідних зразків препарату Фагомаст з різними титрами бактеріофагу *Phage SAvB14*

Групи тварин	Титр <i>Phage SAvB14</i> у дослідному зразку препарату, БУО/мл	Піддано лікуванню		Результати лікування, одужало:	Тривалість лікування, днів
		корів, n (%)	чвертей вимені, n (%)	чвертей вимені, n (%)	
Контрольна	Застосовували препарати на основі антибіотиків	7 (100)	15 (100)	13 (86,6)	3,0
Дослідні	Перша 10^{-7}	5 (100)	11 (100)	9 (81,8)	4,0*
	Друга 10^{-8}	5 (100)	14 (100)	13 (92,8)	3,5*
	Третя 10^{-9}	6 (100)	12 (100)	11 (91,6)	2,5*

Примітка: * – $p \leq 0.05$ порівняно з коровами контрольної групи

З даних табл. 3.45 видно, що добру терапевтичну ефективність проявляли всі партії Фагомасту (81,8 – 92,8 %), проте тривалість лікування

тварин була різною. Так, при застосуванні препарату Фагомаст з титром фагів 10^{-9} БУО/мл тварини одужали майже одночасно з коровами, яким для лікування використовували антибіотики. При цьому тривалість лікування була коротшою на 1 день ($p < 0,05$), ніж у корів другої групи, яким вводили титр фагів 10^{-8} БУО/мл та на 1,5 днів ($p \leq 0,05$) порівняно з коровами першої групи, яким вводили титр фагів 10^{-7} БУО/мл.

Отримані дані підтверджені в лабораторних умовах. Показники секрету корів при застосуванні препарату Фагомаст з різними титрами бактеріофагу *Phage SAvB14* наведено в табл. 3.46.

Таблиця 3.46

Результати тесту з мастидином при застосуванні препарату Фагомаст з різними титрами бактеріофагу *Phage SAvB14*

Тривалість лікування, годин	Групи тварин			
	Контрольна	Дослідні		
		Перша	Друга	Третя
0	· 1 1 1	1 · 1	1 · 1 ·	1 1 · 1
24	++	+++	++-	+-
48	++	++	-+	+-
72	·	1 1	·	1
96	-	+	-	+

Примітки: «1 1 1» та «1 1» – реакція позитивна; «· · ·» – реакція сумнівна; «·» – реакція негативна.

Дані, представлені в табл. 3.46 підтверджують результати терапевтичної ефективності Фагомасту з більш високими вмістом бактеріофагу. Так, після застосування препарату з титром бактеріофагів 10^{-8} та 10^{-9} БУО/мл через 48 години реакція з мастидином була оцінена як сумнівна, а через 72 години – як негативна. Такі ж результати отримали при лікуванні препаратом з антибіотиком. При цьому у корів першої групи (титр фагів у препараті 10^{-7} БУО/мл) спостерігали позитивні результати через 72 та 96 годин відповідно.

Результати дослідження вмісту золотистого стафілококу та титру *Phage SAvB14* у секреті наведено в табл. 3.47.

Кількісні показники вмісту золотистого стафілококу та титру *Phage SAuB14* у секреті корів при застосуванні дослідних зразків препарату Фагомаст, $\bar{x} \pm SE$

Тривалість лікування, год	Групи тварин							
	Контрольна		Дослідні					
			Перша		Друга		Третя	
	Титр <i>Phage SAuB14</i> , БУО/мл	Вміст <i>S. aureus</i> , КУО/мл	Титр <i>Phage SAuB14</i> , БУО/мл	Вміст <i>S. aureus</i> , КУО/мл	Титр <i>Phage SAuB14</i> , БУО/мл	Вміст <i>S. aureus</i> , КУО/мл	Титр <i>Phage SAuB14</i> , БУО/мл	Вміст <i>S. aureus</i> , КУО/мл
0 (початок дослідю)	-	5000±450	-	4200±336	-	4900±392	-	4800±432
12	-	-	$1,2 \cdot 10^{-5} \pm 9,6 \cdot 10^{-3}$	1800±144*	$2,3 \cdot 10^{-6} = 1,8 \cdot 10^{-5}$	1700±136*	$4,5 \cdot 10^{-7} = 3,6 \cdot 10^{-6}$	800±64*
24	-	0	$1,7 \cdot 10^{-5} + 1,3 \cdot 10^{-4}$	980±78	$3,4 \cdot 10^{-6} - 3,0 \cdot 10^{-5}$	850±67	$3,2 \cdot 10^{-7} - 2,8 \cdot 10^{-6}$	420±33
36	-	-	$3,1 \cdot 10^{-4} \pm 2,4 \cdot 10^{-3}$	630±50	$6,2 \cdot 10^{-6} = 4,9 \cdot 10^{-5}$	510±40	$1,5 \cdot 10^{-7} = 1,2 \cdot 10^{-6}$	160±14
48	-	0	$2,6 \cdot 10^{-4} \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$	420±33	$3,7 \cdot 10^{-5} = 3,3 \cdot 10^{-4}$	180±16	$1,2 \cdot 10^{-7} = 1,0 \cdot 10^{-6}$	120±11*
60	-	-	$2,6 \cdot 10^{-4} + 2,0 \cdot 10^{-3}$	250±22	$6,1 \cdot 10^{-5} : 5,4 \cdot 10^{-4}$	60±5	$4,5 \cdot 10^{-5} : 3,6 \cdot 10^{-4}$	0
72	-	0	$3,4 \cdot 10^{-4} + 2,7 \cdot 10^{-3}$	130±11	$4,8 \cdot 10^{-4} : 3,8 \cdot 10^{-3}$	40±4	$3,8 \cdot 10^{-5} : 3,0 \cdot 10^{-4}$	0
84	-	-	$3,5 \cdot 10^{-3} \pm 3,1 \cdot 10^{-2}$	100±9	$2,4 \cdot 10^{-3} = 2,1 \cdot 10^{-2}$	0**	$6,4 \cdot 10^{-3} = 5,7 \cdot 10^{-3}$	0
96	-	0	$1,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,7 \cdot 10^{-2}$	0**	$2,4 \cdot 10^{-3} = 1,9 \cdot 10^{-2}$	0	$1,4 \cdot 10^{-3} = 1,1 \cdot 10^{-3}$	0

Примітки: - не проводили визначення. * – $p \leq 0,05$ порівняно з початковою кількістю, ** – $p \leq 0,05$ порівняно з третьою групою

З даних таблиці 3.47 видно, що вміст *S. aureus* у секреті корів третьої групи через 12 годин після введення препарату з титром фагів 10^9 БУО/мл знизився у 6 разів ($p < 0,05$), а через 48 годин у 40 разів ($p < 0,05$), і після 60 годин терапії взагалі не виділявся. При цьому титр бактеріофагів залишався на рівні 10^7 БУО/мл, і коли кількість чутливих бактерій знизилася до нуля скоротився на 2 порядки. В той час, при титрі 10^7 та 10^8 БУО/мл зменшення золотистого стафілококу відбувалося повільніше, через 12 годин після застосування дослідних зразків першій і другій групі корів кількість бактерій знизилася у 2,3 та 2,8 раза ($p < 0,05$) відповідно. Секрет, вільний від золотистого стафілококу у тварин першої групи отримали через 96 годин, а у другій групі через 84 години, що у 1,6 та 1,4 раза пізніше, ніж у третій групі. Титр бактеріофагів у секреті корів першої і другої груп у першу добу лікування був дещо нижчим, ніж у третій: 10^5 та 10^6 БУО/мл та продовжував поступово знижуватися при зменшенні кількості цільових бактерій.

Отже, аналізуючи результати, отримані у цьому дослідженні, можна зробити висновок, що використання бактеріофагового препарату Фагомаст є альтернативою при лікуванні субклінічного стафілококового маститу у корів. Проте, ефективність фагової терапії залежить від досягнення відносно високих титрів фагів *in situ*. Найкращим дослідним варіантом бактеріофагового препарату Фагомаст виявився з титром *Phage SAvB14* 10^9 БУО/мл.

Результати, які описано в даному підрозділі опубліковано в статті: **Горюк Ю.В.** Визначення ефективності застосування препарату Фагомаст з різними титрами *Phage SAvB14*. *Науковий вісник ветеринарної медицини, Біла Церква*, 2021. №2 С. 57-64. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-168-2-57-64> [10].

3.4.2. Динаміка морфологічних та біохімічних показників крові корів, хворих маститом, при застосуванні препарату Фагомаст

Запалення молочної залози розвивається так само, як і інших органів. Проте, поряд з цим молочна залоза має деякі особливості: висока кількість кровоносних судин та висока доступність її для патогенів [127]. В патогенезі маститу важливе місце займають механізми загального та локального імунітету, при цьому важливим є визначення динаміки імунологічних та біохімічних показників організму тварини при виникненні маститу [395]. Так, при субклінічному маститі дослідники спостерігали значне зниження рівня глюкози в сироватці крові, кальцію, альбумінів. На цьому фоні спостерігали підвищення рівня азоту, креатиніну, загального сироваткового білку та глобулінів [173]. Тому при розробці та апробації нових протимаститних препаратів важливим етапом досліджень є вивчення їх впливу на організм в цілому та динаміку морфологічних та біохімічних показників крові в процесі їх застосування.

Нами було досліджено динаміку впливу бактеріофагового препарату Фагомаст на показники крові корів здорових та хворих на субклінічний мастит. Дослідження проводили в два етапи (рис. 3.23).

На першому етапі ми визначили гематологічні та біохімічні показники здорових корів при введенні препарату Фагомаст, для чого сформовано контрольну (здорові тварини, яким не проводили терапевтичних маніпуляцій) та дослідну (тварини, яким вводили Фагомаст) групи корів.

Другий етап включав визначення терапевтичного впливу препарату Фагомаст на динаміку показників крові корів з субклінічним маститом та порівняння їх з показниками при лікуванні препаратами на основі антибіотиків.

Перед постановкою досліду тварин обстежували на наявність субклінічного маститу за допомогою 2 % мастидину та проводили посів секрету молочної залози для виявлення та ідентифікації збудника. Тварин вважали хворими субклінічною формою маститу, коли реакція з мастидином

була оцінена у «+++» і «++++» та виділявся золотистий стафілокок в кількості більше 1000 КУО/мл.



Рис. 3.23. Схема проведення досліджень для визначення впливу препарату Фагомаст на гематологічні та біохімічні показники здорових корів та хворих на мастит

Схема лікування корів препаратом Фагомаст включала інфузію 10 мл препарату, яку задавали після здоювання двічі на добу. Після інфузії молочну залозу масажували поступальними рухами вгору для кращого розподілення діючої речовини в залозі.

Асептично відбирали зразки секрету корів з кожної чверті вимені для визначення вмісту стафілококів перед кожним наступним введенням препарату. Тварин вважали здоровими коли з чвертей вимені не виділяли золотистий стафілокок і реакція з мастидином була не більшою «+».

Визначення показників крові проводили для здорових корів через 48 годин після застосування Фагомасту. Визначення показників крові для корів, хворих маститом, проводили через 5 днів після завершення лікування.

Відомо, що будь який препарат може чинити вплив на організм тварини [325]. Тому досліди було сформовано таким чином, щоб спочатку визначити вплив бактеріофагового препарату на показники крові здорових корів та порівняти їх з аналогічними показниками тварин, яким не проводили жодних терапевтичних маніпуляцій.

Результати дослідження з визначення морфологічних та біохімічних показників крові фізіологічно здорових корів, яким вводили бактеріофаговий препарат Фагомаст наведено в табл. 3.48 та 3.49.

Таблиця 3.48

Морфологічні показники здорових корів при застосуванні препарату Фагомаст, $\bar{x} \pm SE$

Показник	Групи тварин	
	Контроль, n – 25	Дослід, n – 10
Еритроцити, $10^{12}/л$	6,1 \pm 0,5	6,3 \pm 0,5
Гемоглобін, г/л	123,3 \pm 9,4	120,1 \pm 9,5
Лейкоцити, $10^9/л$	8,5 \pm 0,7	8,7 \pm 0,6

Таблиця 3.49

Біохімічні показники крові здорових корів при застосуванні препарату Фагомаст, $\bar{x} \pm SE$

Показник	Групи тварин	
	Контроль, n – 25	Дослід, n – 25
Загальний білок, г/л	81,5 \pm 6,5	80,7 \pm 6,4
Альбуміни, %	42,9 \pm 3,2	43,8 \pm 3,1

Глобуліни, %	57,1±4,5	56,1±4,5
Білковий коефіцієнт, од.	0,7	0,8
АСТ, Од/л	62,7±5,6	66,7±5,3
АЛТ, Од/л	42,1±3,7	47,4±3,7
Коефіцієнт де Рітца, од.	1,7	1,4
Са, ммоль/л	2,7±0,2	2,5±0,2
Р, ммоль/л	1,8±0,2	1,7±0,1
Сечовина, ммоль/л	4,6±0,4	4,9±0,4
Креатинін, мкмоль/л	103,1±9,2	108,8±9,8
Глюкоза, ммоль/л	2,7±0,2	2,3±0,2
Лужна фосфатаза, Од/л	76,3±6,1	74,4±6,7
Холестерин, ммоль/л	2,6±0,2	2,5±0,2

З даних наведених у табл. 3.48 та 3.49 видно, що введення здоровим тваринам бактеріофагового препарату Фагомаст не спричиняло значних змін показників крові тварин.

Крім того, при введенні препарату Фагомаст здоровим тваринам не спостерігали видимих клінічних ознак таких як, набряку, гіперемії, підвищення загальної та місцевої температури, зміни кількості соматичних клітин.

Тому наступним етапом досліджень було визначити вплив бактеріофагового препарату Фагомаст на показники крові корів при лікуванні субклінічного маститу та порівняти їх з показниками крові корів, яких лікували антибіотиками.

Результати дослідження з визначення морфологічних показників крові корів з ознаками субклінічного маститу за лікування бактеріофаговим препаратом Фагомаст наведено в табл. 3.50.

**Морфологічні показники корів при лікуванні субклінічного маститу
препаратом Фагомаст, $\bar{x} \pm SE$**

Показник	Групи тварин			
	Контроль, n=47		Дослід, n=36	
	До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
Еритроцити, $10^{12}/л$	5,4 \pm 0,4	6,4 \pm 0,5	5,9 \pm 0,4	6,3 \pm 0,5*
Гемоглобін, г/л	94,6 \pm 7,7	118,3 \pm 9,4	96,9 \pm 7,7	119,1 \pm 9,5*
Лейкоцити, $10^9/л$	9,7 \pm 0,7	8,6 \pm 0,7	9,6 \pm 0,7	8,7 \pm 0,6*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно до лікування

Аналізуючи дані табл. 3.50 видно, що показники крові корів з ознаками субклінічного маститу знаходилися в межах фізіологічних значень. Проте слід відмітити, що кількість еритроцитів після проведення лікування препаратом Фагомаст зросла на 7 % ($p < 0,05$). Аналогічна тенденція спостерігалася і при визначенні вмісту гемоглобіну – даний показник зріс, в середньому на 18 % ($p \leq 0,05$). В той час кількість лейкоцитів зменшилася на 10,5 % ($p \leq 0,05$). Схожі результати отримані при лікуванні антибіотиками.

Результати з визначення біохімічних показників крові корів з ознаками субклінічного маститу при лікуванні бактеріофаговим препаратом Фагомаст наведено в табл. 3.51.

Як видно з табл. 3.51, в сироватці крові тварин рівень загального білка практично не змінився як при лікуванні препаратом на основі антибіотиків, так і при застосуванні Фагомасту. Вміст загального білка в сироватці крові корів до початку лікування складав 79,7 \pm 7,11 г/л, що лише на 2,3 % ($p < 0,05$) менше, ніж після одужання тварин та на 1,7 % менше, ніж у другій групі. Отримані результати не мали значних коливань. При визначенні вмісту

альбумінів та глобулінів встановлено, що білковий коефіцієнт був на 0,3 ($p \leq 0,05$) одиниці нижчий у корів з ознаками субклінічного маститу. Після лікування препаратом Фагомаст він становив 0,9. Ці зміни в білковому спектрі свідчать про зменшення запальних процесів та сприятливі зміни в організмі корови.

Таблиця 3.51

Біохімічні показники крові корів при лікуванні бактеріофаговим препаратом Фагомаст, $\bar{x} \pm SE$

Показник	Групи тварин			
	Контроль, n=47		Дослід, n=36	
	До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
Загальний білок, г/л	80,3±7,2	82,1±6,5	79,7±7,1	80,9±6,4*
Альбуміни, %	33,9±2,9	47,9±3,2	34,8±2,8	44,6±4,0
Глобуліни, %	66,1±5,9	52,1±4,6	65,2±5,2	55,4±4,4
Білковий коефіцієнт, од.	0,5	0,9	0,5	0,8*
АСТ, Од/л	85,1±6,8	62,8±5,6	83,5±6,7	67,7±5,3*
АЛТ, Од/л	93,4±7,4	42,3±3,8	92,7±7,4	45,9±3,7*
Коефіцієнт де Рітца, од.	0,9	1,7	0,9	1,5*
Са, ммоль/л	2,0±0,2	2,7±0,2	1,9±0,1	2,6±0,2
Р, ммоль/л	1,3±0,1	1,9±0,2	1,4±0,1	1,8±0,1
Сечовина, ммоль/л	12,3±1,1	4,8±0,5*	11,3±1,0	4,7±0,4*
Креатинін, мкмоль/л	161,4±14,5	104,1±9,2	152,5±13,7	106,9±9,7*
Глюкоза, ммоль/л	2,7±0,2	2,8±0,2	2,8±0,2	2,6±0,2
Лужна фосфатаза, Од/л	71,9±6,4	75,7±6,1	72,5±6,5	75,1±6,7
Холестерин, ммоль/л	2,5±0,2	2,6±0,2	2,6±0,2	2,6±0,2

Примітка: * $P \leq 0,05$ порівняно до лікування

Істотні зміни спостерігали при дослідженні концентрації ферментів аспартатамінотрасферази і аланінамінотрасферази (АСТ і АЛТ). Після застосування Фагомасту їх рівень зменшився на 25 та 54,4 % ($p < 0,05$) відповідно. При цьому коефіцієнт де Рітуса зріс від 0,9 до 1,7.

Рівні сироваткового Са та Р у маститних корів були нижчими порівняно з контрольною групою. Після лікування вони зросли на 0,8 та 0,4 ммоль/л при лікуванні «Фагомастом» та на 0,7 і 0,6 ммоль/л при лікуванні антибіотиками відповідно.

Вміст сечовини був вищий у маститних корів у 2,3 раза ($p < 0,05$) порівняно зі здоровими тваринами, проте після завершення лікування зменшився у 2,4 раза ($p < 0,05$) та був в межах фізіологічних значень.

Вміст креатиніну в сироватці крові клінічно здорових корів був в 1,5 раза ($p \leq 0,05$) менше, ніж у хворих корів. Лікування маститу Фагомастом сприяло його зниженню до $106,9 \pm 9,7$ ммоль/л, а препаратами на основі антибіотиків до $104,1 \pm 9,2$ ммоль/л.

Динаміка вмісту глюкози, холестерину та лужної фосфатази в процесі проведення досліджень майже не змінювалася, параметри їх значень були в межах фізіологічних нормативів та майже не відрізнялися від показників контрольних груп.

Отже, результати досліджень виявили, що після лікування корів за маститу розробленим фаговим препаратом відмічається відновлення показників крові до фізіологічних значень упродовж 5 діб. При цьому динаміка змін морфологічних і біохімічних показників крові у тварин, яким застосовували бактеріофаг, була практично аналогічна, як у корів, яких лікували антибіотиками.

Результати, які описано в даному підрозділі опубліковано в статті: **Горюк Ю., Кухтин М., Горюк В., Просяний С.** Динаміка морфологічних та біохімічних показників крові корів хворих маститом при застосуванні фагового препарату Фагомаст. *Аграрний вісник Причорномор'я, Одеса*, 2021. № 100. С. 44–51. Doi: <https://doi.org/10.37000/abbsl.2021.100.09> [12]

3.4.3. Вплив препарату Фагомаст на показники природної резистентності корів, хворих на мастит.

Важливим етапом роботи було визначити вплив препарату Фагомаст на показники природної резистентності корів при маститі. Результати з визначення бактерицидної активності сироватки крові (БАСК), лізоцимної активності сироватки крові (ЛАСК), циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) та фагоцитарної активності нейтрофілів (ФА) у корів з ознаками субклінічного маститу при лікуванні бактериофаговим препаратом Фагомаст наведено в табл. 3.52. При цьому проводили порівняння з показниками корів, яких лікували антибіотиками.

Таблиця 3.52

Показники природної резистентності при лікуванні корів за субклінічного маститу препаратом Фагомаст, $\bar{x} \pm SE$

Показник	Групи тварин			
	Контроль, n=47		Дослід, n=36	
	До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
БАСК, %	36,0±2,8	42,3±3,8*	35,2±2,8	41,6±3,7*
ЛАСК, %	22,3±2,0	28,2±2,5*	21,6±1,7	27,9±2,2*
ЦІК, ммоль/л	88,7-7,9	69,8-6,2*	87,5+7,8	67,5+6,0*
ФА, %	46,2-3,6	42,3-3,8*	46,8+4,2	41,9+3,7*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно до лікування

З даних табл. 3.52 видно, що застосування препарату Фагомаст для лікування корів, хворих на субклінічний мастит спричинило зниження фагоцитарної активності на 4,9 % ($p < 0,05$), що вказує на відновлення клітинної ланки імунітету.

При дослідженні стану гуморальної ланки неспецифічної резистентності корів, хворих на субклінічний мастит встановлено, що застосування

Фагомасту сприяє підвищення бактерицидної та лізоцимної активності сироватки крові хворих корів. Так, після лікування БАСК зросла на 6,4 % ($p < 0,05$), а ЛАСК на 6,3 % ($p < 0,05$), що свідчить про зменшення запального процесу в організмі корів та їх одужання. На фоні цього спостерігали зменшення концентрації ЦК у сироватці крові, що вказує на нормалізуючий вплив терапії на організм тварин. Схожі результати ми отримали у контрольній групі, де тварин лікували препаратами на основі антибіотиків.

Отже, результати досліджень показали, що при застосуванні препарату Фагомаст для лікування корів, хворих на мастит зростають показники бактерицидної та лізоцимної активності сироватки крові на 5 добу від початку лікування. Крім того, спостерігали стимулюючий вплив на процеси фагоцитозу нейтрофілів крові. Отже, препарат Фагомаст сприяє відновленню метаболічного гомеостазу організму, нормалізує показники клітинної та гуморальної ланки імунітету у корів.

3.4.4. Фармакотерапевтична ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст за субклінічного маститу у корів

Проведені нами попередні дослідження з визначення фармакологічної ефективності розробленого препарату Фагомаст на основі бактеріофагу *Phage SAyB14* щодо *S. aureus* var. *bovis in vitro*, вказують на обнадійливі перспективи його застосування в якості антимікробного засобу при боротьбі зі стафілококовими маститами у корів. Отримані лабораторні результати вказують на потенціал терапії маститу корів бактеріофагами і потребують подальшої перевірки шляхом проведення досліджень в умовах *in vivo*.

Нами було досліджено ефективність застосування розробленого бактеріофагового препарату Фагомаст при лікуванні субклінічного маститу у корів *in vivo*. Для цього у кожному господарстві сформовано групи корів за принципом аналогів: контрольну та дослідну. Перед постановкою досліду тварин обстежували як і в підрозділах 3.3.2 та 3.3.3.

Коровам дослідної групи вводили препарат на основі бактеріофагів Фагомаст. Схеми лікування корів дослідних груп включала інтрацистернальну інфузію 10 мл препарату, який вводили після здоювання двічі на добу. До доїння дійки обробляли за звичайною процедурою, яка застосовується на фермі. Після доїння дійки корів, взятих в дослід, обробляли 70 % спиртом та вводили дослідний препарат. Після інфузії молочну залозу масажували поступальними рухами догори для кращого розподілення діючої речовини в залозі.

Коровам контрольної групи інтрацистернально вводили протимаститні препарати, які використовувалися на фермах (Пенікан П, Мастіст Форте, Мастидев Форте, Мастилекс, Біофлок LC) згідно протоколів лікування та інструкцій щодо їх застосування.

Контроль терапевтичної ефективності проводили через 5 днів після останнього введення препарату за допомогою визначення кількості соматичних клітин та вмісту золотистого стафілококу. Четверті вимені вважали здоровими при вмісті соматичних клітин менше 300 тис./см³ та відсутності стафілококу.

Результати дослідження з визначення терапевтичної ефективності застосування бактеріофагового препарату Фагомаст за субклінічного маститу корів у порівнянні з іншими протимаститними препаратами з вмістом антибіотиків наведено в табл. 3.53.

З даних, наведених в таблиці 3.53 видно, що препарат Фагомаст проявляє високу терапевтичну ефективність. Кількість тварин дослідних груп, які одужали після застосування даного препарату склала 94,8 %, а кількість здорових чверток вимені – 92,1 %. Порівнюючи лікування Фагомастом з препаратами на основі антибіотиків, кількість здорових чверток вимені не виходила за межі 6 %.

В табл. 3.54 наведено результати лабораторних досліджень з визначення терапевтичної ефективності бактеріофагового препарату Фагомаст при субклінічному маститі корів.

Ефективність застосування бактеріофагового препарату Фагомаст при лікуванні корів за субклінічного маститу

Групи тварин	Препарат, який застосовували	Піддано лікуванню:				Результати лікування, одужало:	
		корів		четвертей вимені		четвертей вимені	
		п	%	п	%	п	%
Контроль, n=47	Пенікан П	11	100	29	100	25	86,2
	Мастіет Форте	13	100	22	100	20	93,7
	Мастидев Форте	7	100	16	100	15	90,6
	Мастилекс	8	100	17	100	12	70,6
	Біофлок LC	8	100	19	100	19	100
Дослід, n=39	Фагомаст	39	100	76	100	70	92,1

Результати, наведені в табл. 3.54, свідчать про те, що застосування бактеріофагового препарату Фагомаст значно впливає на зменшення кількості *S. aureus* та соматичних клітин у секреті молочної залози корів, хворих субклінічною формою маститу. Так, кількість соматичних клітин зменшилася в середньому у 16,8 раза ($p \leq 0,05$), і становила $250,1 \pm 22,3$ тис./см³, що відповідає вимогам екстра гатунку відповідно ДСТУ 3662:2018 «Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови». При цьому золотистий стафілокок із свіжонадосного молока не виділяли. Схожі результати отримані при визначенні терапевтичної ефективності препаратів на основі антибіотиків, проте незначне виділення *S. aureus* ($50,5 \pm 4,0 - 80,3 \pm 6,2$ КУО/см³) спостерігалось при лікуванні препаратами Мастіет Форте та Біофлок LC, що може свідчити про його наявність на шкірі дійок вимені.

Таблиця 3.54

Ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст при лікуванні корів за субклінічного маститу, $\bar{x} \pm SE$

Групи тварин	Препарат, який застосовували	Показники секрету вимені			
		кількість <i>S. aureus</i> , КУО/см ³		кількість соматичних клітин, тис./см ³	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
Контроль, n=47	Пенікан П	2900±261	0	3800±304	260,4±20,7
	Мастіст Форте	5100±459	80,3±6,2	4300±344	190,6±17,7
	Мастидев Форте	2900±261	0	5400±486	320,1±29,8
	Мастилекс	5300±477	0	4100±328	120,9±10,8
	Біофлок LC	4100±369	50,5±4,0	4500±405	198,7±15,8
Дослід, n=39	Фагомаст	3700±333	0	4200±336	250,1±22,3

Результати проведених досліджень показали, що лікувальний ефект при застосуванні препарату Фагомаст не поступається антибіотикам. Кількість чвертей вимені, які відновили функції склала 92,1 %. Ефективність застосування Фагомаст також підтверджена мікробіологічними дослідженнями з визначення кількості золотистого стафілококу до початку та після лікування. *S. aureus* після завершення лікування взагалі не виділявся зі свіжонадоєного молока.

Отже, проведені дослідження підтверджують високу терапевтичну ефективність розробленого нами препарату бактеріофагу для лікування маститу у корів та дозволять підвищити екологічність отриманої продукції і мінімізувати обмежувальні заходи щодо випуску продукції при використанні антибактеріальних засобів.

Результати, які описано в даному підрозділі опубліковано в статті: **Горюк Ю.В.** Терапевтична ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст для лікування субклінічного маститу корів. *Вісник Полтавської державної аграрної академії, Полтава, 2021. №3. С. 204–209. Doi: <https://doi.org/10.31210/visnyk2021.03.25> [11].*

3.4.5. Фармакотерапевтична ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст за клінічного маститу у корів

Попередні наші дослідження показали високу терапевтичну ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст при лікуванні субклінічного стафілококового маститу у корів: 92,1 % уражених чвертей вимені відновили свої функції, через 5 днів після завершення лікування; золотистий стафілокок з молока даних чверток не виділявся; кількість соматичних клітин була $250,1 \pm 22,3$ тис./см³. Тому наступним етапом наших досліджень було визначення терапевтичної ефективності препарату Фагомаст при лікуванні корів за клінічного прояву маститу, порівнюючи з іншими протимаститними препаратами з вмістом антибіотиків. Результати дослідження наведено в табл. 3.55.

Ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст при лікуванні корів за клінічного маститу

Групи тварин	Препарат, який застосовували	Піддано лікуванню				Результати лікування, одужало			
		корів		четвертей вимені		корів		четвертей вимені	
		п	%	п	%	п	%	п	%
Контроль. n-17	Пенікан П	3	100	7	100	2	66,7	5	71,4
	Мастіет Форте	4	100	8	100	4	100	8	100
	Мастидев Форте	4	100	9	100	4	100	9	100
	Мастилекс	3	100	5	100	3	100	5	100
	Біофлок І.С	3	100	6	100	2	66,7	4	66,7
Дослід. n-7	Фагомаст	7	100	15	100	5	71,4	11	73,3

З даних, наведених у табл. 3.55 видно, що ефективність лікування клінічного маститу збудником, якого був золотистий стафілокок, антибактеріальними препаратами з вмістом антибіотиків була досить висока. Зокрема при лікуванні такими протимаститними препаратами, як Мастіет Форте, Мастидев Форте та Мастилекс ефективність лікування становила 100 %, так як після проведеного курсу лікування клінічних патологічних змін у молочній залозі не відмічали, реакція з мастидином була негативна, збудник з молочної залози не виділявся, а кількість соматичних клітин не перевищувала 300 тис./см³. За лікування внутрішньоцистернальними препаратами Пенікан П та Біофлок І.С спостерігали ефективність лікування на рівні 66,7 %.

У дослідній групі в загальному ефективність лікування становила 71,4 % і після курсу лікування видимих змін молочної залози не спостерігали, реакція з мастидином також була негативна та кількість соматичних клітин не перевищувала 350 тис./см³, що вказує на завершення запального процесу.

У табл. 3.56 наведено результати, щодо тривалості періоду лікування клінічної форми стафілококового маститу за лікування антибактеріальними препаратами з вмістом антибіотиків та препаратом на основі стафілококового фагу.

Таблиця 3.56

Тривалість лікування корів за клінічного маститу бактеріофаговим препаратом Фагомаст

Групи тварин	Препарат, який застосовували	Тривалість лікування, діб	Тривалість вибракування молока, діб (згідно інструкції)
Контроль, n=17	Пенікан П	5,5	8
	Мастіет Форте	5	9
	Мастилев Форте	5	9
	Мастилекс	6	9
	Біофлюк І.С	5,5	8
Дослід, n 7	Фагомаст	5	6

З даних табл. 3.56 видно, що в середньому курс лікування препаратами на основі антибіотиків становив 5 – 6 діб, а фаговим препаратом 5 діб. це вказує на те, що вірогідної різниці не має. Проте, встановлено, що період часу вибракування молока за лікування препаратами з вмістом антибіотиків після останнього введення засобу становив в середньому 3 – 4 доби в загальному 8 – 19 діб від початку лікування. Тобто у цей період часу молоко не використовувалося для реалізації на переробку, водночас за лікування маститу фаговим препаратом вибракування молока було тільки протягом періоду позитивної реакції з мастидином (3 – 5 діб). Це вказує на те, що під час

лікування фагами значно скорочується час вибраковування молока, що позитивно впливає на ефективність лікування в цілому.

Таким чином, підсумовуючи проведені дослідження необхідно відзначити, що ефективність лікування клінічного стафілококового маститу бактеріофаговим препаратом Фагомаст в загальному не поступається традиційним методом лікування із застосуванням препаратів-антибіотиків. Однак значною перевагою під час фаготерапії маститу є значно менший термін вибраковування молока, за рахунок відсутності у ньому залишкових кількостей антибіотиків.

Результати, які описано в даному підрозділі опубліковано в статті: **Horiuk Y.** Therapeutic efficacy of bacteriophage drug Fagomast in clinical mastitis of cows. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 2022. Vol. 24(105). P. 89–93. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10513> [279]

3.4.6. Визначення економічної ефективності лікування при застосуванні препарату Фагомаст

Розрахунок економічного збитку розраховували за умови захворювання корів субклінічним маститом при ураженні однієї чвертки вимені.

Розрахуємо збитки від зниження продуктивності хворих тварин і якості отриманого молока.

Збиток від зниження продуктивності корів внаслідок захворювання розраховують:

$$Z_1 = M \times (B_3 - B_{\text{хв}}) \times T \times Ц, \quad (3.2)$$

де M – кількість захворілих, голів

B_3 – середньодобова кількість молока, отримана від здорових тварин, кг

$B_{\text{хв}}$ – середньодобова кількість молока, отримана від хворих тварин, кг

T – тривалість вибракування молока, днів

$Ц$ – закупівельна ціна одиниці продукції.

Контрольна група: $Z_1 = 10 \times (15 - 9) \times 3,5 \times 15 = 3150$ грн.

Дослідна група: $Z_1 = 10 \cdot (15 - 9) \times 3,5 \cdot 15 = 3150$ грн.

Отже, збиток від зниження продуктивності тварин в обох групах склав по 3150 гривень.

Збиток від зниження якості продукції, отриманої від хворих тварин:

$$Z_2 = V_p \cdot (C_z - C_{zv}), \quad (3.3)$$

де V_p – кількість реалізованої продукції зниженої якості, кг.

C_z і C_{zv} – ціни одиниці продукції, одержаної від здорових і хворих тварин відповідно, грн.

Контрольна група: $Z_2 = 810 \cdot (15 - 7) = 6480$ грн. (V_p – враховано терміни вибракування молока при лікуванні антибіотиками)

Дослідна група: $Z_2 = 210 \cdot (15 - 7) = 1680$ грн.

Загальна сума збитку складе:

$$Z = Z_1 + Z_2 \quad (3.4)$$

Контрольна група $3150 + 6480 = 9630$

Дослідна група $3150 + 1680 = 4830$.

Розрахунок витрат на проведення ветеринарних заходів визначають:

$$V_v = V_1 + V_2, \quad (3.5)$$

де V_1 – оплата часу лікаря ветеринарної медицини, витраченого на проведення терапевтичних процедур, грн.

V_2 – вартість ветеринарних препаратів, витрачених в процесі лікування, грн.

Розрахунок оплати часу лікаря ветеринарної медицини, витраченого на проведення процедури:

$$V_1 = Ч \cdot K_v \cdot M_{zv}, \quad (3.6)$$

Де $Ч$ – вартість часу, затраченого лікарем ветеринарної медицини на одне внутріцистернальне введення одній корові при умові витрачання 10 хв на одне введення і вартості хвилини робочого часу 1,51 грн. + 0,33грн. ССВ – 1,84грн.

K_v – кількість введень препарату на курс лікування однієї тварини

M_{zv} – кількість хворих тварин.

Контрольна група $V_1 = 18,4 \times 3 \times 10 = 552$

Дослідна група $V_1 = 18,4 \times 6 \times 10 = 1104$

Визначення вартості препаратів, що були використані для лікування:

$$V_2 = Ц_0 \times K_n \times M_{хв}, \quad (3.7)$$

$Ц_0$ – ціна препарату, грн

K_n – кількість введень препарату на курс лікування однієї тварини

$M_{хв}$ – кількість хворих тварин.

Контрольна група $V_2 = 58 \times 3 \times 10 = 1740$ грн

Дослідна група $V_2 = 23,7 \times 6 \times 10 = 1422$ грн.

Визначення вартості ветеринарних витрат:

$$V_n = V_1 + V_2 \quad (3.8)$$

Контрольна група $V_n = 552 + 1740 = 2292$ грн

Дослідна група $V_n = 1104 + 1422 = 2526$ грн.

На підставі проведених розрахунків результати проведених заходів визначимо за формулою:

$$E_{\text{еф}} = (Z_{\text{контр.група}} + V_{\text{контр.група}}) - (Z_{\text{досл.група}} + V_{\text{досл.група}}), \quad (3.9)$$

де $E_{\text{еф}}$ – економічний ефективність

$Z_{\text{контр.група}}$ – збитки в контрольній групі

$Z_{\text{досл.група}}$ – збитки в дослідній групі

$V_{\text{контр.група}}$ – витрати на лікування в контрольній групі

$V_{\text{досл.група}}$ – витрати на лікування в дослідній групі

$E_{\text{еф}} = (9630 + 2292) - (4830 + 2526) = 4566$ грн.

Економічний ефект при лікуванні корів за субклінічного маститу із застосуванням препарату Фагомаст склав 4566 гривнів на 10 тварин, або на одну голову 456,6 грн.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

За останні роки спостерігається різке зростання попиту на органічні продукти тваринного походження. Хоча прямих доказів того, що органічні молоко та молочні продукти відрізняються по смакових чи поживних якостях немає. Однак органічні продукти тваринного походження мають менший вміст пестицидів та хімічних ветеринарних препаратів. Крім того органічне ведення тваринництва передбачає обмеження щодо використання антибіотиків, які є основним засобом контролю захворювання у молочній худобі, в тому числі і маститу у корів. Виникнення антимікробної резистентності є природною біологічною відповіддю на використання антимікробних речовин, які створюють селективний тиск, сприяє відбору, виживанню та розмноженню резистентних штамів мікроорганізмів, які через харчовий ланцюг можуть передаватися споживачам. Тому одним з необхідних та перспективних напрямків є розробка препаратів, які б ефективно знищували патогенні мікроорганізми та не чинили негативного впливу на організм тварини.

Мастит залишається широко поширеним захворюванням молочного стада у всьому світі [331, 537]. Проведені нами дослідження показали, що мастит діагностується у 35,7 % молочних корів. Отримані нами результати знаходяться в діапазоні поширеності запалення молочної залози опублікованими іншими дослідниками в Україні та закордоном. За даними [480] поширеність маститів в корів на українських молочних комплексах складала 56 %. Досить значне поширення маститу задокументовано [368], з досліджених корів 395 корів підвищений рівень соматичних клітин виявили у 316, що склало 80 %. При цьому клінічну форму захворювання реєстрували у 6,8 % досліджених випадків, а субклінічну – 73,1 %. Це підтверджує, що мастит у корів є серйозною проблемою молочного сектору не тільки нашої держави, але і усього світу. На думку дослідників [269] поширеність маститу

у стаді більше 40 % не лише зменшує надої молока та погіршує його якість, що призводить до економічних втрат, але і становить значну загрозу населенню. Хоча отримані нами результати є дещо нижчими не можна залишати поза увагою дану проблему.

При проведенні досліджень ми реєстрували субклінічну форму маститу у 4,6 разів частіше ніж клінічний прояв запалення. Субклінічним маститом хворіло 24,6 % у лактаційний та 38,5 % корів у сухостійний періоди. Аналогічні дані, щодо переважання субклінічного маститу було висвітлено в інших працях [79, 368]. Наприклад, за даними [481] субклінічна форма в 15 – 40 разів поширеніша ніж клінічна. Вона зазвичай передує останній, май більш тривалий період та призводить до більших економічних втрат. Крім того, важливим моментом залишається те, що субклінічно ураженні тварини залишаються постійним джерелом збудників маститу.

За даними численних досліджень [310, 330, 363], найбільш частими патогенами, що викликають інтрамамарне запалення є *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp., *Mycoplasma* spp., *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* тощо. В результаті проведених досліджень нами встановлено, що у період лактації субклінічний мастит стрептококової етіології діагностується у 47,7 % випадків, стафілококової – у 45,5 % та змішаної етіології – у 6,8 %, а в період сухостою відповідно в 62,5; 26,2 і 8,3 % випадків. Основним збудником стафілококового маститу є *S. aureus subsp. aureus*, який виділявся з уражених маститом чверток у 93,3 %, а стрептококового – *S. agalactiae* і *S. dysgalactiae*, у 47,4 %. Про поширеність стафілококового маститу повідомляють і інші вчені. Так, за даними мікробіологічних досліджень проведених [130] *S. aureus* було виділено з 51,2 % проб маститного молока. Висока поширеність *S. aureus* може бути пов'язана з недотриманням санітарно-гігієнічних вимог при доїнні тварин, невчасному вибракуванні хронічно хворих корів, відсутністю діагностики та лікуванню тварин в період сухостою. Очевидно, що збудники маститу можуть легко передаватися від заражених частин вимені до здорових через предмети

догляду за тваринами, руки доярів тощо та при сприятливих умовах спричиняти нові випадки захворювань.

Антибіотикотерапія тривалий час служила ефективним засобом для контролю захворювань молочної залози у корів. Проте, нині стійкість збудників маститу до антимікробних засобів є широко поширеною проблемою [65, 379, 413]. Антибіотикорезистентність збудників маститу включає два основних аспекти: перший це зниження ефективності терапії та сприяння хронізації запального процесу, а другий – це потенційна загроза передачі стійких бактерій до людини через харчовий ланцюг. При цьому патогенні бактерії стають практично нечутливими для більшості антибіотиків. Після неефективного лікування такі корови часто стають безсимптомними носіями антибіотикорезистентних штамів бактерій [73].

У розвинутих країнах використання антибіотиків у ветеринарній медицині чітко контролюється [356]. Проте законодавче регулювання реалізації антимікробних засобів в межах нашої держави все ще знаходиться на етапах розробки.

Нашими дослідженнями підтверджено, що безконтрольне застосування антибактеріальних речовин протягом 10 – 12 років на молочних фермах призвело до резистентності у 66,7 – 83,3 % культур *S. aureus* до 33,3 % препаратів та 100 % резистентність – до 58,3 % препаратів. Тому, для ефективного проведення лікувально-профілактичних протимаститних заходів у молочних господарствах необхідне постійне дослідження антибіотикограми до збудників маститу.

Мікроорганізми є основною причиною виникнення інфекції молочної залози у корів і здатність бактерій продукувати біоплівку вважається важливою вірулентною властивістю в патогенезі маститу [482].

Проведені нами дослідження показали, що серед збудників, як гострої, так і хронічної форм маститу найбільшою плівкоутворюючою здатністю володіли штами *S. aureus*, які у 1,4 – 1,5 раза ($p \leq 0,05$) частіше утворювали мікробну біоплівку, ніж штами *Str. agalactiae* і *Str. dysgalactiae*. Крім того,

здатність формувати біоплівки визначається не тільки видом збудника, але і характером інфекційного процесу, в якому бере участь збудник. Ми виявили, що штами *S. aureus*, які виділяли у корів з субклінічним маститом та при носійстві в 2,0 рази ($p < 0,05$) більше формували біоплівки, ніж при клінічній формі маститу. Також встановлено, що *Str. agalactiae* і *Str. dysgalactiae* формували слабку і середньої щільності біоплівку у 86,0 – 94,5 % досліджених штамів, водночас, практично 100 % штамів бактерій *S. aureus*, які були виділені із молочної залози хворих на мастит корів, формували щільні та середні біоплівки. Так, згідно даних [84, 452], що хронічні запальні процеси, зокрема і мастит, спричиняються мікроорганізмами у біоплівці і традиційна антибактеріальна терапія є малоефективною. Повідомлялося, що *S. aureus*, проявляє високу здатності формувати біоплівку, яка резистентна до багатьох антибіотиків, в тому числі і метициліну [297].

Наші дослідження виявили, що найвища чутливість планктонних бактерій збудників маститу стрептококів і стафілококів була до цефтріаксону і доксицикліну (100 – 80,9 %). Чутливість стрептококів до антибіотиків аміноглікозидів і макролідів становила в межах 41,2 – 59,0 %, а чутливість *S. aureus* 23,8 – 30,9 %. Виділені бактерії проявляли чутливість до енорофлосацину на рівні 52,3 – 65,3 %. Найменш чутливі стрептококи і стафілококи були до бензилпеніциліну 32,3 – 45,4 %, а чутливість штамів *S. aureus* становила 19,0 %. У дослідженнях [556] також повідомляється про високу і помірну чутливість збудників маститу до антибіотиків різних фармакологічних груп. Незважаючи на значну чутливість планктонних форм бактерій, виділених при маститі, до антибіотиків, не завжди досягається позитивний результат під час лікування [472], оскільки в патогенезі субклінічної форми маститу провідна роль належить біоплівковим формам бактерій. Проведені дослідження збігаються з чисельними даними про необхідність визначення чутливості мікрофлори до антибіотиків під час лікування маститу.

Під час визначення впливу антибіотиків на біоплівкові форми бактерій встановлено, що клітини у біоплівка стійкіші до антибактеріальних препаратів. Із досліджених антибіотиків найкраще діяв енрофлоксацин ймовірно через низьку його молекулярну масу та здатність проникати через пори й канали біоплівки до мікробних клітин. Після дії енрофлоксацину на біоплівки клітини стрептококів і стафілококів повністю були інактивовані. Про те, що фторхінолони легко дифундують через біоплівку і ефективно знижують її ріст та бактеріцидно діють на мікробні клітини повідомляють і інші вчені, які проводили досліді *in vitro* [335]. Також, ефективними на бактерії у біоплівках виявилися антибіотики цефтріаксон і доксициклін. Після дії цефтріаксону кількість бактерій, що вижила становила $\lg 1,9 \pm 1,1$ КУО/см² площі біоплівки, а доксицикліну $\lg 2,5 \pm 1,2$ КУО/см². У той же час, за умови дії антибіотиків пеніцилінів, аміноглікозидів і макролідів кількість мікробних клітин, що вижили становила близько $\lg 5,3$ КУО/см² площі біоплівки. Про підвищену стійкість бактерій у біоплівці, виділених за субклінічної форми маститу, до антибіотиків повідомляють дослідження інших вчених [297].

Таким чином, проведені лабораторні мікробіологічні дослідження вказують на те, що вивчення закономірностей формування біоплівки збудниками маститу корів є важливими для проведення ефективних протимаститних заходів на молочних фермах та розроблення нових протимаститних препаратів із специфічними властивостями, які будуть діяти на мікроорганізми у біоплівках, з метою ефективного лікування запальних процесів, в тому числі і маститу у корів.

Отже, наші дослідження показують, що золотистий стафілокок є одним з основних збудників маститу, при цьому патогенез стафілококового маститу ускладнюється здатністю цього патогену до утворення щільних біоплівок, що сприяє персистенції патогену у молочній залозі та переходу захворювання в хронічну форму. Крім того даний збудник виявився найбільш стійким до впливу антибіотиків, як у планктонній формі та і в біоплівковій. Тому в

подальшому наші дослідження були направлені на вивчення поширення та властивостей саме цього патогену.

Наявність золотистого стафілококу в молоці-сировині вважається як пряма небезпека для споживачів, а кількісна міра цієї небезпеки є показником її ризику [197]. При цьому, виявлення значної кількості золотистого стафілококу в оброблених молочних продуктах у більшості випадків вважається як надходження їх від хворих на мастит корів [141]. У нашому дослідженні було визначено вплив шкіри дійок здорових і хворих на мастит корів та доїльного обладнання на обсіяння молока коров'ячого золотистим стафілококом. Встановлено, що шкіра дійок здорових корів є природним біотопом для бактерій роду *Staphylococcus*, водночас золотистий стафілокок виділяли тільки в $26,8 \pm 2,4$ % випадків. При цьому перед- і післядоїльна обробка шкіри дійок засобами Udder Wash і Udder Forte знижує частоту виявлення золотистого стафілококу до $4,1 \pm 0,3$ % випадків. Кількісне визначення стафілококів, в тому числі і золотистого, на шкірі дійок виявило зменшення останнього з $283,5 \pm 21,2$ до $27,6 \pm 2,1$ КУО/см³ змиву післядоїльної обробки. Ми вважаємо, що обробка перед- і післядоїльними засобами сприяє ефективному видаленню стафілококів зі шкіри, проте через деякий час їх кількість на дійках відновлюється за рахунок виходу із глибини шкірних залоз, де вони перебувають у біоплівці. Про відновлення мікрофлори шкіри після її санації повідомляють дослідження інших авторів [403]. Зокрема, у дослідженнях [6] встановлено, що обробка шкіри дійок хлоровмісними засобами не звільняла її від носійства золотистого стафілококу. Крім того, встановлено, що за субклінічного чи клінічного маститу різко зростає кількість стафілококів, в тому числі і золотистого, на шкірі дійок. Так, виявлено, що за субклінічної форми стафілококового маститу з шкіри дійок виділяли *S. aureus* у кількості $790,6 \pm 65,4$ КУО/см³ змиву. Водночас, за клінічної форми маститу кількість *S. aureus* зростала в середньому до 8 тис. КУО/см³ змиву. Ці дані підтверджують результати багатьох досліджень [141] і вказують на необхідність суворого дотримання протимаститних заходів

щодо окремого доїння хворих на мастит корів, так як вони є основним джерелом золотистого стафілококу на молочній фермі.

Також встановлено, що за умови санітарної обробки доїльного обладнання з почерговим використанням лужних і кислотних мийно-дезінфікуючих засобів, тільки з 25 % змивів виділялися стафілококи, а золотистий – до 5 % проб. Виділення стафілококів із доїльного обладнання після обробки мийно-дезінфікуючими засобами ми пов'язуємо із здатністю цих бактерій до формування щільної біоплівки, яка стійка до деградації санітарними засобами, про що повідомляють ряд авторів. Саме завдяки виживанню золотистого стафілококу у біоплівках на доїльному обладнанні та наявності його на шкірі дійок пояснюється виявлення даних бактерій у молоці, отриманому від здорових корів. Зокрема, згідно наших досліджень до 60 % проб молока-сировини містили кількість золотистого стафілококу до 200 КУО/см³.

Отже, підсумовуючи можна відмітити, що навіть за використання засобів для перед- і післядоїльної обробки шкіри дійок корів та санітарної обробки доїльного обладнання з використанням лужних і кислотних мийно-дезінфікуючих засобів у молоці-сировині можлива наявність певної кількості золотистого стафілококу. Проте, кількість *S. aureus* у свіжонадосному молоці від здорових корів не повинна перевищувати 200 КУО/см³. Виділення більшої кількості буде свідчити про неефективність протимаститних заходів, санації шкіри дійок та санобробки доїльного обладнання.

Вважається, що здатність стафілококів до утворення певних токсичних речовин, особливо ентеротоксинів, відіграє значну роль у розвитку маститу, створюючи сприятливе середовище для колонізації [435]. Утворені токсини підтримують патогенез *S. aureus*, знижуючи імунну відповідь молочної залози та чутливість до антибіотиків [166]. За результатами наших досліджень встановлено, що золотистий стафілокок виділений з секрету молочної залози корів хворих на мастит володіє більш вираженими патогенними властивостями ніж стафілококи виділені з інших біотипів молочних ферм,

вони у 96,8 – 100 % утворювали коагулазу, гемолізину, лецитиназу та ДНК-азу та продукували ентеротоксини типу *D* у 70,6 % випадків. Інші дослідники також частіше виявляли *S. aureus* з більш вираженими патогенними властивостями від корів хворих на мастит, ніж у ізолятів від здорових тварин чи навколишнього середовища [195]. Авторами показано, що серед 120 проаналізованих ізолятів *S. aureus* лише 17 (14 %) не були ентеротоксигенними. Решта 103 ізолятів (86 %) містили комбінацію принаймні від 2 до 5 типів ентеротоксинів [131, 158, 258].

При вивченні мінімальної бактерицидної концентрації антибіотиків щодо культур золотистих стафілококів виділених від корів хворих маститом виявили, що з поміж чотирьох досліджених антибіотиків, тетрациклін, енрофлоксацин, амоксицилін з клавулановою кислотою та гентаміцин, найнижча МБК на планктонні клітини *S. aureus* виявилася у амоксициліну з клавулановою кислотою і енрофлоксацину, яка становила від 0,05 до 0,8 мг/мл. У антибіотиків тетрацикліну та гентаміцину МБК на планктонні культури коливалася в межах від 0,4 до 12,5 мг/мл. У дослідженнях [260, 351] також вказується на високу чутливість (73,4 – 100 %) мікрофлори виділеної при маститі до антибіотиків аміноглікозидів та фторхінолонів. Ці дослідження співпадають із численними даними про необхідність визначення чутливості мікрофлори до антибіотиків при лікуванні маститу. Проте, незважаючи на значну чутливість планктонних форм бактерій, виділених при маститі до антибіотиків, не завжди досягається позитивний результат при лікуванні [184, 362], так як в патогенезі хронічного субклінічного маститу провідна роль належить біоплівковим формам бактерій [468].

При визначенні впливу МБК антибіотиків на біоплівкові форми бактерій встановлено, що МБК на клітини *S. aureus* у біоплівці виявилася у декілька разів вища, порівняно з тією, що діяла на планктонні форми мікроорганізмів. Також про підвищену стійкість бактерій у біоплівці, виділених при маститі у корів до антибіотиків повідомляють дослідження інших вчених [509].

За нашими даними у 5,9 % культур *S. aureus* МБК амоксициліна з клавулановою кислотою становила 0,1 мг/мл, а в більше половини культур – 58,8 % МБК становила від 1,5 до 3,1 мг/мл. Тобто у більше половини культур *S. aureus* МБК на біоплівкові форми виявилася у 7,5 раз (р < 0,05) більшою, порівняно з МБК на планктонні форми. Практично аналогічні дані і при визначенні МБК енрофлоксацину на біоплівки *S. aureus*. Також відмічено, що МБК антибіотиків амоксициліна з клавулановою кислотою і енрофлоксацина значно сильніше діяла на клітини *S. aureus* у біоплівці, порівняно з тетрацикліном і гентаміцином. Після дії найвищої МБК, яка діяла на планктонні форми амоксициліна і енрофлоксацина (0,8 мг/мл) кількість клітин у біоплівці становила $1,8 \pm 1,3$ і $2,1 \pm 1,5$ Іг КУО/см² змиву, відповідно, а за дії найвищої МБК тетрацикліну і гентаміцину кількість *S. aureus* у біоплівці становила $2,8 \pm 1,6$ КУО/см².

Ефективнішу дію амоксициліна з клавулановою кислотою і енрофлоксацина на біоплівкові форми *S. aureus* можна пояснити через порівняння молекулярної ваги даних антибіотиків. Молекулярна вага амоксициліна з клавулановою кислотою становить 365,4/199,16 г/моль, а у енрофлоксацина 359,4 г/моль. У той же час у антибіотиків тетрацикліну і гентаміцину молекулярна вага становила 444,4 і 477,6 г/моль відповідно, що в середньому в 1,3 раз (р ≤ 0,05) більша, ніж у амоксициліна і енрофлоксацина. Завдяки меншій молекулярній вазі антибіотики легше дифундують через пори і канали біоплівки і ефективно знижують кількість мікробних клітин. Про залежність між молекулярною вагою і впливом на біоплівки повідомляють і інші вчені, які проводили дослідження *in vitro* [32].

Отже, підсумовуючи дослідження можна стверджувати, що виділені при субклінічних формах маститу корів бактерії мають здатність формувати біоплівку високої щільності, яка ускладнює ефективність протимікробної терапії хвороби та визначає хронічний характер її перебігу. Тому, з метою обґрунтування ефективності лікування маститу необхідно підбирати таку концентрацію протимікробних препаратів, яка ефективно діє на мікробні

клітини сформовані у біоплівки. Проте, іноді використання таких високих концентрацій антибіотиків може призводити до негативного впливу на організм тварини вцілому, спричинюючи алергічні реакції, пригнічення роботи імунної системи тощо.

Здатність до колонізації та спричинення інфекцій у різних господарів, включаючи людей, є важливою характеристикою для *S. aureus* [500]. Використання різних методик дозволило диференціювати штами *S. aureus* на конкретні ековари та біотири (генетичне походження, клони або лінії), які зазвичай асоціюються з конкретними господарями серед ссавців, людини, птиці, собак, великої рогатої худоби тощо. Подальші дослідження показали, що деякі лінії стафілококів не обмежені, тобто одні і ті ж самі штами можуть колонізувати або ж спричиняти захворювання у широкого спектру видів, включаючи людину. Наприклад, штам ST1 в основному «людського походження» може спричиняти мастит у ВРХ [261]. Результати наших досліджень показують, що золотистий стафілокок практично в однакових кількостях виділявся, як від корів (50,1 %), так і від людей (62,4 %). При цьому частота його виділення серед інших видів складала 20,3 %. Вміст золотистого стафілококу значно варіює на фермах (7 – 69 %) різних країн світу. За даними більшості дослідників ці дані залежали від практик ведення тваринництва, санітарно-гігієнічних заходів на молочних фермах, технологій виготовлення та зберігання молочних продуктів, географічного розташування, методів виділення бактерій тощо. Проте досить мало літератури описує видовий склад стафілококів у середовищі ферми, хоча достеменно відомо, що звичайна сапрофітна мікрофлора може бути потенційним джерелом генів антибіотикостійкості [490, 492]. Наші дослідження виявили досить широкий діапазон стафілококів з різних джерел існування на території молочних ферм. Так, поряд з золотистим стафілококом, виділяли такі види як: *S. haemolyticus* (20,3 %), *S. saprophyticus* (13,6 %), *S. xylosus* (14,0 %), *S. chromogenes* (11,1 %), *S. sciuri* (8,8 %), *S. epidermidis* (4,8 %), *S. hominis* (3,4 %), *S. cohnii* (2,6 %) та *S. warner* (0,7 %). При цьому ми спостерігали приблизно однакове обсягання

корів, людей та навколишнього середовища видами *S. haemolyticus* (44,5:70,8:58,8 %), *S. epidermidis* (12,7:16,6:9,1 %), *S. xylosus* (26,0:37,4:52,9 %). Виділення певних видів, що одночасно зустрічаються у корів, обслуговуючого персоналу та в середовищі ферми свідчить про потенціал передачі одних і тих самих бактерій між трьома секторами, а отже і передачі патогенних властивостей, в тому числі і стійкості до антибіотиків [193].

Стійкість до β -лактамних антибіотиків є специфічною патогенною особливістю стафілококів [374, 410]. Наше дослідження виявило, що на молочних фермах західного регіону України циркулюють штами *S. aureus*, які проявляють стійкість до метициліну. Їх частка складала 26,8 % від загальної кількості досліджених культур золотистого стафілококу. При цьому вони були виділені з різних джерел в межах території молочних ферм. Іншими видами стафілококів, які були стійкими до метициліну виявилися *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, та *S. chromogenes*. При цьому їх кількість була в 1,1, 1,3, 1,6 та 5,5 рази ($p \leq 0,05$) відповідно меншою, а *S. hominis* в 1,2 рази ($p \leq 0,05$) більшою порівняно з *S. aureus*.

Раніше вченими було описано здатність набувати метицилінрезистентності у *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* та *S. schleiferi*, які зустрічалися у домашніх тварин [377]. Нині також відомі випадки метицилінрезистентності серед коагулазонегативних стафілококів. При цьому *SCC_{mec}* демонструє більшу поліморфну структуру у стійких до метициліну коагулазонегативних стафілококів (*MR-CoNS*), з частими комбінаціями *scr_{mec}*, які не описані в MRSA, та множинними та / або негіловими алотипами *scr*. Елементи SCC, що не містять *mecA*, були зареєстровані у *S. haemolyticus* та *S. epidermidis* [372].

Крім того, виявлені стафілококи, стійкі до метициліну, були резистентними щонайменше до двох інших антибіотиків. Штами *Sam-1*, *Sam-2* та *Shom-1* були нечутливими до чотирьох з п'яти досліджених препаратів, *Sam-14*, *Sam-15*, *Shaem-1* та *Sx-1* до трьох, *Sch-1* та *Ss-2* до двох.

Отже, можна зробити висновок, що різні види стафілококів, які циркулюють на молочних фермах, являють собою великий резервуар генів резистентності до антимікробних препаратів, які в процесі одержання молока можуть його забруднювати та передаватися людям. Тому необхідно встановити постійний контроль за виділенням не лише *MRSA*, але і інших стафілококів, стійких до β -лактамних антибіотиків.

Оскільки протягом останніх десятиліть розвиток нових антибіотиків для боротьби з виниклою резистентністю призупинився, терапія бактеріофагами знову привернула увагу як підхід до лікування бактеріальних інфекцій. Положення та політика щодо клінічного використання фагів зараз переглядаються західними країнами, відкриваючи новий шлях для лікування бактеріальних інфекцій MDR. У порівнянні з антибіотиками, фаготерапія, як правило, безпечна, має набагато вужчий антибактеріальний спектр і може бути ефективною проти чутливих і стійких до антибіотиків бактерій.

Зацікавленість до використання фагів як протимікробних препаратів збільшується не тільки зі сторони гуманної, але і ветеринарної медицини [133]. Фаги є ефективним мікробіологічним інструментом, здатним боротися зі специфічними штамми бактерій, що спричиняють інфекційні захворювання [162]. Антибактеріальний ефект препаратів бактеріофагів полягає в тому, що генома фага проникає в бактерію з подальшим лізисом інфікованої клітини через розмноження фага. Після лізису бактеріофаги, що вийшли в зовнішнє середовище повторно інфікують здорові бактеріальні клітини, аж до повного знищення їх у вогнищі запалення [373]. Саме тому бактеріофаги відіграють важливу роль в еволюції бактерій і реалізації їх патогенного потенціалу. У зв'язку з цим актуальним є пошук літичних фагів, для застосування їх з лікувальною метою.

Літичні бактеріофаги привертають все більшу увагу дослідників, як можливі засоби у боротьбі з антибіотикорезистентними бактеріями, серед яких *S. aureus* є одним з найнебезпечніших [162, 355].

На ринку України доступні комерційні препарати бактеріофагів націлені на знищення золотистого стафілококу. При дослідженні їх впливу на культури *S. aureus*, які виділені з секрету молочної залози корів при маститі встановлено, що препарати на основі бактеріофагів промислового виробництва (Стафілококовий бактеріофаг®, Інтестіфаг®) неефективні щодо культур золотистих стафілококів, виділених з молочних продуктів та від корів, хворих маститом. Це свідчить про те, що коло господарів штамів бактеріофагів, використаних при виробництві препаратів, не включає штами *S. aureus var. bovis*.

Нині немає досліджень, які б описували бактеріофаги специфічні проти *S. aureus*, як основного збудника маститу у корів на території України. Тому подальші наші дослідження були направлені на виділення та дослідження основних характеристик таких бактеріофагів.

Для культивування та парощування титрів бактеріофагів використовували типовий штам *Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f*, який володіє здатністю до утворення щільних біоплівок, утворює ентеротоксини типу D та проявляє стійкість до антибіотиків.

При виділенні специфічних бактеріофагів фаголізати часто забруднюються сторонньою мікрофлорою, бактеріями-господарями або макромолекулами після їх загибелі [94, 580]. Тому для інактивації бактеріальної культури при селекції фагів застосовують такі способи очищення: обробку пасажу фага трихлорметаном, прогрівання або мембранну фільтрацію.

Метод очищення стафілококових бактеріофагів від бактеріальних клітин трихлорметаном виявився найбільш ефективним методом. Так, лише за першого пасажу виділили *S. aureus*. Це пов'язано з великою кількістю стафілококів, оскільки вони були бактеріями-господарями і ми їх вносили додатково. Проте дослідники повідомляють про різні результати щодо сприйнятливості фагів до хлороформу [316]. Багато фагів є нестійкими до хлороформу тому більшість дослідників наполягають на визначенні

чутливості бактеріофагів до нього, перед початком досліджень [98]. Тому дана методика не зовсім підходить для первісного виділення стафілококового бактеріофагу. Крім того при надходженні в організм хлороформ піддається біотрансформації, в ході якої утворюються токсичні метаболіти, що стимулюють перекисне окислення ліпідів, що призводить до порушення функціональних властивостей мембран, пригнічення активності мембранозв'язаних ферментів, тим самим викликаючи порушення роботи з боку внутрішніх органів і систем [227].

Стороння мікрофлора фаголізату за впливу температури 60 ± 2 °C протягом 30 хвилин представлена термостійкими бактеріями: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*. В загальному температурна обробка при вищезазначених параметрах - це ефективний за якістю, але тривалий за часом метод [320].

Так, при двоступеневому фільтруванні фаголізату за першого та другого пасажів виділяли бактерії групи кишкових паличок, а саме представники роду *Klebsiella*. Наявність даних мікроорганізмів можна пояснити їхніми розмірами. діаметр паличок коливається в середньому в межах 0,3 – 1,0 мкм, що дозволяє проходити через пори бактеріального фільтру з розміром 0,45 мкм [112]. При подальшому пасажуванні з застосуванням фільтрації через мембранні фільтри залишкова мікрофлора не виділялася.

Результати проведених досліджень щодо очищення стафілококових бактеріофагів від бактеріальних клітин вказують на ефективність застосування багатоступеневої фільтрації. Даний метод є оптимальним за рахунок скорочення витрат часу на проведення досліджень, порівняно з температурною обробкою та є безпечним для організму людини порівняно з впливом хлороформу.

На початкових етапах нами було виділено та вивчено літичний спектр дії 17 штамів бактеріофагів. В результаті таких дослідження для подальшої роботи обрано штами, які проявляли найширший спектр літичної дії щодо культур золотистого стафілококу виділеного з різних біотопів молочних ферм.

Розмір і форма негативних колоній є важливою характеристикою фага [315, 371]. Морфологія негативної колонії може бути використана як таксономічна ознака під час первинної класифікації фагів, оскільки є надзвичайно специфічною для конкретного штаму, а іноді для групи споріднених бактеріофагів [144, 585]. Тому на першому етапі роботи ми проводили виділення бактеріофагів шляхом посіву досліджуваного матеріалу методом двошарового агару. Для отримання чистої лінії фага проводили від 5 до 7 пасажів з ізолюваних негативних колоній. В результаті чого отримали негативні колонії фагів, які мали розмір 1 – 2 мм округлої форми з чіткими краями. Даний тип є характерним для бактеріофагів золотистих стафілококів. Проте отримані фагові бляшки були різного ступеня прозорості.

Результати точкового випробування та аналіз утворення бляшок відображає 2 різні механізми, що лежать в основі бактеріолізу фагом [396]. Формування літичної плями являє собою поєднання як лізису, пов'язаного з циклом реплікації фагів (літичного), так і лізису спричиненого безпосереднім зв'язуванням фага з бактерією [589]. Другий механізм передбачає виникнення лізису просто як результат прикріплення фагів до поверхні бактеріальної клітини з подальшим пригніченням будь-якого мультиплікативного процесу розмноження вірусу. Тому прозорість фагових бляшок напряму залежить від здатності фага лізувати бактеріальну культуру [396, 589]. Так, напівпрозорі колонії зазвичай утворюють помірні бактеріофаги, оскільки більшість бактеріальних клітин в середині колонії залишаються в стані лізогенії. Подібні результати були отримані вченими при дослідженні фагів на молочних фермах. Так, фаг *ΦSA039* лізував усі виділені культури стафілококів на молочних фермах, проте колонії були напівпрозорими [321], що є свідченням слабкої літичної активності.

Штами бактеріофагів з коротким латентним періодом та з великою кількістю віріонів після руйнування бактеріальної клітини вважаються ідеальними для створення терапевтичних засобів [371]. Результати досліджень виявили, що латентний період фагу *Phage SAvB14* становив, у середньому 35

хвилин. При цьому кількість активних віріонів збільшувалася на 8 порядків, порівняно з початковою кількістю. Тоді як, при дослідженні кривих росту інших бактеріофагів взятих в дослід латентний період становив 35 – 60 хвилин, а збільшення титру бактеріофагів відбувалося на 2 порядки. У дослідженні [144] описані вірулентні бактеріофаги (*MSA6*) виділені від корів хворих на мастит. У *MSA6* був короткий латентний період (15 хвилин) і порівняно невеликий розмір вибуху (23 БУО/клітина). Отримані фаги були рекомендовані для створення препарату на основі фагового коктейлю з метою лікування захворювань у корів.

Існує декілька проблем пов'язаних з застосуванням фагів в інтрамамальному середовищі через вплив на них різних екологічних та хімічних факторів [316, 568]. Основною метою цього дослідження було оцінити вплив температури, хлороформу та рН середовища на активність бактеріофагів *in vitro*.

Вплив температури на фагову активність має велике значення [465]. При тестуванні впливу ступеня прогрівання на фаги оцінюють їх здатність якнайдовше зберігати свої властивості при найвищих температурах [320]. Це пояснюється тим що в природніх умовах застосування фагів вимагає толерантності до коливання температурних режимів. Зміна температури може виникнути через погодні умови при зберіганні чи транспортуванні фагових препаратів, фізіологічні зміни в організмі тварин. Усі досліджені нами фаги показали зниження літичної активності вже через 10 хв за температури 45 °С.

При промисловому виготовленні медикаментів деякі процеси можуть вимагати високого температурного режиму. Це важливо, особливо з точки зору комерційного виробництва фагових препаратів. Фаги, насамперед, складається з білка [515, 580] і будь-який тривалий вплив високої температури може спричинити денатурацію фагових білків, що відповідають за інфікування бактерій-господарів. Наші результати співвідносяться з попередніми дослідженнями, де показано, що фармакологічно-літична здатність фага знижується при тривалому впливі високих температур [515].

Результати показали, що *Phage SAvB14* стійкий до хлороформу, оскільки його титр не змінювався протягом 45 хвилин, як і в більшості фагів *S. aureus* [37].

pH середовища, в якому розмножується фаг, також є важливим чинником [546]. Оптимальні значення водневого показника для росту і розмноження бактеріофагів в умовах *in vitro* мають бути максимально наближеними до природнього середовища, з якого виділений даний фаг. pH молока знаходиться в межах 6,6 - 6,7. Результати наших досліджень показали, що максимальна реплікація фагів відбулася при pH 6 – 7. Схожі результати були отримані іншими вченими. Вивчалася стабільність щодо pH в буферах при діапазоні pH 2–12. Фаг SLPW, який активний проти *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* показав відносно високий рівень виживання (більше 80 %) при pH від 6 до 10. Поза цими значеннями активність різко знижувалася [580].

Важливою характеристикою для фагів є їх здатність зберігати літичну активність при зберіганні за низьких температур. Оскільки фаг *Phage SAvB14* був більш стійкішим до коливань високих температур та pH ми визначили його здатність зберігати літичність в умовах холодильника. Результати показали, що фаг *Phage SAvB14* здатний зберігати свою літичну активність протягом 3 місяців. Проте кращі результати отримані при його зберіганні за температури 4 та 8 °C, порівняно з 0 °C. Подальше 5 – 6 кратне пасажування бактеріофагів на індикаторних культурах дозволяло відновити їх вихідний титр. Знижену активність можна пояснити тим що заморожування/відтавання може впливати на фагову ультраструктуру. Це особливо актуально для хвостових фагів з родини *Myoviridae*. Делікатні волокна хвоста можуть відмежуватися від головки вірусу через зміни осмотичного тиску [540]. Така дисоціація робить фаг неефективним як контрольний агент. Дослідження показують [349], що хвостові фаги були найбільш стійкими до зберігання. Деякі з них зберігали життєздатність навіть після 10 – 12 років при температурі 4 °C. У дослідженні Mullap також показана хороша стабільність фагів при зберіганні їх при

температурі 4°C протягом 6 місяців. Фаголізати *Lactococcus sp.*, які зберігалися при температурі 2 – 5°C, показали незначне зниження титру (на 5 – 10 %) через 6 місяців [123]. Аналогічно, [414] рекомендують 4 °C в якості оптимальної температури для короткого (не довше 40 днів) зберігання фагів з стічних вод. При цьому зберігання бактеріофагів при температурах нижчих нуля не рекомендується, оскільки кристалічна структура льоду може спричинити їх руйнування, як це було раніше продемонстровано [577]. Така температура вимагає внесення захисного середовища: гліцерину, 7 % диметилсульфоксиду тощо.

Проведені дослідження показали, що відхилення від стандартних умов зберігання фагів призвели до різкого зниження фагової активності. Проте фаг *Phage SAyB14* більш стійкіший до впливів високих температур і коливання рН та впливу хлороформу, порівняно з іншими дослідженими фагами, а отже є кращим для створення препарату проти стафілококового маститу корів.

Ключовим аспектом оцінювання фармакології антибактеріальних засобів є їх мінімальна інгібуюча концентрація [554]. Це найменша антибактеріальна концентрація препарату, яка впливає на запобігання росту бактерій. Проте, визначити МІК для фагових препаратів практично неможливо, оскільки ключовим моментом фаготерапії є те, що фаги здатні до реплікації, що відповідно призводить до збільшення їх концентрації [28]. Тим не менше, повинна існувати деяка мінімальна концентрація фагів, яка здатна спричинити бажаний антибактеріальний ефект.

Наші дослідження показують, що використання різних титрів бактеріофагу *SAyB14* знищувало цільові бактерії *S. aureus* вже протягом перших 2 годин. Слід відмітити закономірність – чим вищий титр фагів, тим інтенсивніше прогресувала фагова інфекція.

Також можна вважати, що відбувалася реплікація фагів наступних поколінь, оскільки кількість життєздатних бактерій не збільшувалася. Так, вміст стафілококу при взаємодії з фагами, титр яких був 10^{10} БУО/см³ (найменший взятий у дослід) зменшувався в 1,6 разів ($p < 0,05$) через 12 годин

взаємодії порівняно з контролем. Таку ж картину спостерігали і при найвищому титрі (10^{-6} БУО/см³) – вміст *S. aureus var. bovis* зменшився у 2,3 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

У природних умовах популяція бактерій – це не однорідна сукупність однаково сприйнятливих клітин. Всі бактерії генетично різні, крім того деякі з них можуть проявляти часткову або ж повну стійкість. Крім того, може виникати просторова гетерогенність, наприклад її можна спостерігати коли бактерії, що знаходяться у заглибинах тканин, починають активно рости і при цьому титр фагів знижується. Сприятливі бактерії не будуть розміщуватися рівномірно, на їх ріст будуть впливати зовнішні фактори, такі як наявність живильних речовин, температура, рН тощо [254].

Одним із способів вирішення даних проблем є підтримання високого титру фагів у вогнищі інфекції протягом певного періоду. Аналіз отриманих нами даних показав, що внесення фагу з титром 10^{-8} БУО/см³ у 1,2 рази ($p < 0,05$) ефективніше знищував *S. aureus var. bovis*, ніж при внесенні фаголізату з титром 10^{-7} БУО/см³, та у 1,5 рази ($p < 0,05$) порівняно з титром 10^{-6} БУО/см³. Результати отримані при дослідженні впливу фагу з титром 10^{-9} БУО/см³ майже не відрізнялися від тих, що отримані при випробуванні титру 10^{-8} БУО/см³.

Протилежним явищем є здатність фагів впливати на бактерії залежно від можливої їх адсорбції у клітину господаря. Вважається, що чим більше чутливих до фагів бактерій наявних в середовищі, тим більша ймовірність того, що вільний фаг стане адсорбованим [177, 226].

У даному експерименті ми виявляємо вірулентну фагову інфекцію чутливої бактеріальної культури, яка приводить до пригнічення метаболізму клітин-стафілококів і, майже до повного бактеріолізу. Проте інтенсивність літичної активності фагів залежала від кількості чутливих бактеріальних клітин у об'ємі поживного середовища. При внесенні в живильний бульйон $5,0 \pm 0,1 \cdot 10^7$ КУО/мл мікробних клітин стафілококів встановлено, що через дві години взаємодії фаг-бактерія кількість життєздатних клітин зменшилася в 1,1

раза ($p < 0,05$), порівняно з початковою кількістю. Водночас за впливу фагу на бактерії з початковою кількістю стафілококів $1,0 \pm 0,008 \cdot 10^4$ і $1,0 \pm 0,002 \cdot 10^5$ КУО/мл середовища фармакологічно-літична активність була ефективніша, оскільки кількість бактерій зменшилася, в середньому в 1,3 рази ($p < 0,05$). Аналогічну закономірність встановлено і через чотири години фагової інфекції щодо стафілококів. Подібні результати досліджень були отримані іншими вченими, які зазначали, що для ефективного лікування фагами вирішальним фактором у боротьбі з бактеріальними патогенами є оптимальне співвідношення фагів і бактерій (PHR). Дослідження проведені [464] показали, що співвідношення бактерій до фагів 1:100 викликало незначне зниження кількості життєздатних клітин *P. aeruginosa*, в той час, як співвідношення 1:1000 було в 10 разів ефективніше протягом 24 годин лікування. Інші вчені досліджували взаємодію фагів з 72-х годинною біоплівкою кишкової палички. Протягом короткого періоду (30 хв) спостерігали значно більше порушення біоплівки у співвідношенні бактерія до фагу 1:100, порівняно з співвідношенням 1:10 [478, 485]. Отже, для ефективної фагової терапії необхідна велика концентрація фагів у середовищі (вогнищі запалення) для швидкого контакту вірусу з бактеріями. Навіть якщо фаги викликають зараження однієї патогенної клітини – найближча чутлива мікробна клітина може бути достатньо далеко від зараженої. Тому для поширення фагової епідемії у вогнищі запалення потрібно досягнення значного інфікування мікробних клітин фагом.

Попередні наші дослідження з вивчення кількості бактеріальних патогенів при різних формах маститу виявили, що при субклінічному маститі кількість золотистих стафілококів була, в середньому в 3 рази менша, ніж при гострій формі. Тому підхід до застосування препаратів бактеріофагів для лікування субклінічного маститу має відрізнятися від клінічного. При розробці фагового препарату для лікування субклінічного маститу необхідно збільшити титр фагу в препараті або його дозування, порівняно з клінічною

формою, оскільки існує низька ймовірність контакту фагу з чутливою мікробною клітиною.

Дослідження повідомляють [161, 353, 427, 528], що співіснування бактерій і фагів може бути нестійким через недостатності живильних речовин для бактерій, слабкій інтенсивності фагової інфекції тощо. Результати досліджень встановили, що після 24 годин взаємодії стафілококів з фагом у варіанті з великою початковою кількістю мікробних клітин (10^5 КУО/мл) не відбулося повного лізису стафілококів, їх кількість становила $7,8 \pm 0,3 \cdot 10^2$ КУО/мл. Це дає підставу вважати, що при великій концентрації бактерій відбувається поступове зниження живильних речовин у середовищі, внаслідок чого фаги переходять у стан лізогенії. Лізогенез – це паразитарний симбіоз, де фаги затримують лізис клітин, інтегруються в бактеріальний геном і перебувають в слабо активному стані [353]. Згідно досліджень [165, 558, 559] лізогенез частіше зустрічається, коли множинність інфекції велика та виникає нестача живильних речовин.

Отже, підсумовуючи результати дослідження можна відзначити, на перспективність ефективного використання виділеного нами специфічного стафілококового бактеріофагу *Phage SAvB14* при маститі корів спричиненого *S. aureus var. bovis*. Однак, при підборі дози і концентрації бактеріофагу необхідно враховувати особливості взаємодії фаг-бактерія для забезпечення ефективного лікування.

Наступним етапом було визначити діапазон господарів виділених бактеріофагів та їх літичну активність щодо них. Для цього ми вивчили вплив обраних фагів на культури золотистого стафілококу різного біотипу. Так, всі виділені фаги в певній мірі лізували штами золотистих стафілококів виділених від корів. Бактеріофаги *Phage SAvB07*, *Phage SAvB08* та *Phage SAvB12* лізували дослідженні бактеріальні штами у 25 – 45,6 % випадків, тобто проявляли слабку літичну дію. Лише *Phage SAvB14* лізував 94,1 % штами бактерій золотистого стафілококу виділеного від корів. Вивчення літичної активності бактеріофагів, які можуть бути використані у терапії проти маститу проводили

Ganaie et al. [319]. У їх дослідженні описані виділення та характеристика двох літичних фагів *SAJK-IND* та *MSP* специфічних для золотистого стафілокока. При цьому *SAJK-IND* проявив 100 % літичну активність відносно декількох штамів золотистого стафілокока, виділених від маститих корів, тоді як *MSP* мав лише 40 % літичної активності.

Нами було досліджено штами *S. aureus*, які виділені від людей. Це дало можливість підтвердити специфічність господарів, оскільки лише *Phage SAvB14* пригнічував ріст однієї культури *S. aureus var. hominis*. Подібні результати були отримані дослідниками [318] при вивченні господарів фагів *CSI* і *DW2*, виділених від корів з ознаками маститу. Дані фаги лізували штами бактерій виділені від великої рогатої худоби. Проте, обидва фаги не утворювали помітних колоній при культивуванні на штаммах виділених від людей в Ірландських лікарнях.

Також вчені повідомляють про наявність досить широкого діапазону активності серед стафілококових ендолізинів, домен зв'язування з клітинною стінкою яких розпізнає різні види стафілококів [231, 423]. Наші дослідження виявили, що специфічні фаги *S. aureus var. bovis* здатні інфікувати такі види стафілококів, як *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* та *S. xylosus*. При цьому найширше коло господарів виявили у фагу *Phage SAvB14*, що може свідчити про його полівалентність. Широкий діапазон активності можна пояснити сайтами розщеплення СНАР (цистеїн- та гістидин-залежна амідогідролаза / пептидаза) і амідазних доменів стафілококових ендолізинів, які консервативні в пептидогліканах як *S. aureus*, так і інших видів стафілококів.

Виявлено, що всі досліджені стафілококові бактеріофаги краще розмножувалися в клітинах *S. xylosus*, ніж в інших видах коагулазонегативних стафілококів. Схожі дані отримані [295] коли при дослідженні діапазонів господарів фагів дикого типу *Team1*, *phi812* виявлено, що фаги, які розмножуються на *S. xylosus*, були здатні лізували 52 з 57 різних штамів *S. aureus*.

Отже, проведені дослідження вказують на те, що для ефективної фагової терапії потрібно враховувати біологічне походження штамів стафілококів і відповідно використовувати бактеріофаги, які є специфічними для своїх господарів. Найбільш широким діапазоном господарів серед досліджених бактеріофагів, які виділені на молочних фермах володіє *Phage SAyB14*, що робить його кращим кандидатом при створенні фагового препарату для лікування маститу корів. В якості додаткового господаря для його реплікації можна використовувати *S. xyloxy*, який є непатогенним.

Бактеріофаги здатні згубно взаємодіяти з бактеріями, що утворюють біоплівки на різних етапах її формування: «до» утворення, «під час» дозрівання та «після» становлення [453, 582]. Їх потенціал взаємодіяти з біоплівковими бактеріями на будь-якому з цих етапів залежить від кількості бактеріальних мішеней та сприйнятливості мікроорганізмів до фагової адсорбції [200]. Лізис мікробних клітин у біоплівці за дії бактеріофагу можливий тільки за умови руйнування екзополісахаридного матриксу. Це відбувається тоді, коли фаги продукують специфічні ферменти-деполімерази, які руйнують значну частину матриксу і роблять вразливими плівкоутворюючі бактерії [244, 574].

Отримані дані показали, що оптична густина розчину барвника з молоді біоплівки (24 години) *S. aureus var. bovis* під впливом репродукції бактеріофагу *Phage SAyB14* протягом 32 годин зменшилася на $34,5 \pm 0,7$ %. Це вказує на те, що у складі матриксу присутні компоненти, які не лізуються ферментами даного бактеріофагу. Про різноманіття структурних компонентів матриксу біоплівки повідомляють дослідження [287, 574], які виявляли у біоплівках *S. aureus* 12,0 % екзополісахаридів та близько 15,0 % нуклеїнових кислот. Також повідомляється, що для активного лізису біоплівки фаговими деполімеразами необхідна специфічна сприйнятливість бактеріальних клітин до рецепторів фагу [247, 578]. Ми вважаємо, що під час пасивного впливу бактеріофагу на молоді 24-годинні біоплівки проходить псевдолізогенне зараження мікробних клітин, так як протягом 8 годин взаємодії фагу і

стафілококів біоплівка не руйнувалася, а навіть росла. Це вказує на те, що протягом даного часу бактеріофаг інфікує плівкоутворюючі клітини стафілококу, проте лізису їх ще не відбувається внаслідок розвитку псевдолізогенії: форми взаємодії фага і мікробної клітини, за якої нуклеїнова кислота вірусу перебуває у клітині в нестабільному, неактивному стані. У таких клітинах внаслідок інтенсивності їх розвитку недостатньо енергії для фага, щоб ініціювати генетичну експресію для літичної реакції [353]. Тому протягом даного періоду відбувається наростання біоплівки і, відповідно, збільшення оптичної густини розчину барвника з неї.

При цьому кількість клітин стафілококів збільшувалася у 1,8 рази протягом 4 годин після інфікування. Крім того, повної загибелі мікробних клітин за дії бактеріофагу на молоді біоплівки упродовж 32 годин контакту не відмічали, а кількість стафілококів виділялася $1,3 \pm 0,1 \cdot 10^3$ КУО/мл змиву. Отже, проведені дослідження вказують на те, що зрілі 72-годинні біоплівкові форми стафілококів активніше лізуються під впливом бактеріофагу, ніж їх молоді 24-годинні форми.

У дослідженнях [417] повідомляється, що для пригнічення швидкоростучих бактеріальних клітин в умовах *in vitro* необхідна постійна висока концентрація бактеріофагу в $10^7 - 10^8$ БУО/мл. Ймовірно, під час гострого септичного процесу застосування фагів буде менш ефективне, ніж за хронічного, так як популяції патогенних бактерій повністю не знищені, а будуть підтримуватися на певному високому рівні. У ряді досліджень [453] показано, що ефективне видалення біоплівкових форм бактерій сумішшю фагів у концентрації 10^9 БУО/мл залежало від часу впливу і за температури 37 °С найбільше знищення мікробних клітин відбувалося на 72 години. Інші дослідники [162] при використанні комбінованого стафілококового бактеріофагу для деградації біоплівки, сформованої *S. aureus*, повністю видаляли її через 48 годин за температури 37 °С. Такі стафілококові бактеріофаги, як ISP, Romulas і Remus у концентрації 10^9 БУО/мл у лабораторних умовах руйнували біоплівки на 37,8, 34,4 та 60,4 % відповідно.

через 24 години [469]. Аналогічні результати були отримані у дослідженнях [564], які застосовували суміш фагів *phil PLA ROI1* та *phil PLA CIC* проти сформованої біоплівки *S. aureus*. Фаги знижували кількість мікробних клітин на 2 log у біоплівці через 8 год після обробки за температури 37 °C інкубації.

Субклінічний мастит корів у 90–95 % випадків перебігає у хронічній формі і основний збудник *S. aureus* формує зрілі біоплівки, які впливають на ефективність антибактеріальної терапії. У наших дослідженнях за впливу бактеріофагу *Phage SAvB14* на 72-годинні біоплівки, утворені *S. aureus var. bovis*, відбулася їх деградація на $77,5 \pm 1,4$ % протягом 32 годин за температури 37 °C. При цьому життєздатні мікробні клітини з біоплівки не виділяли, а титр бактеріофагів становив близько 10^1 БУО/мл. У даному випадку можемо стверджувати, що фаги проникли та досягли клітин стафілококів по всій товщі біоплівки і бактерії виявилися сприйнятливими до даного фагу. Тобто, відбулася пасивна обробка біоплівки фагами, за якої лізис залежав від швидкості поглинання вірусу. Незважаючи на отримання нами доволі ефективної дії бактеріофагу щодо біоплівки сформованої *S. aureus var. bovis* в умовах *in vitro*, ряд авторів [83] повідомляють, що *in situ* процес лізису біоплівки залежить від багатьох чинників, які пов'язані з фізіологічним станом господаря. Однак дослідники [39, 87] притримуються одностайної думки, що при практичному застосуванні бактеріофагів повинна використовуватися концентрація фагу не менше 10^8 БУО/мл протягом певного часу для пасивного лізису біоплівки. Так як активна обробка фагами повинна дати достатню кількість нащадків для інфікування мікробних клітин і лізису біоплівки.

Отже результати досліджень вказують на те, що мікробні клітини молодих біоплівок не піддаються повному лізису за дії навіть специфічного бактеріофагу. Водночас, за впливу бактеріофагу на зрілі 72 годинні біоплівки спостерігали деградацію $77,5 \pm 1,4$ % біоплівки на 32 годину за температури 37 °C. При цьому з біоплівки не виділяли життєздатних клітин *S. aureus*. Це свідчить про високу літичну активність бактеріофагу відносно зрілих

біоплівкових бактерій та можливість його застосування при хронічних стафілококових інфекціях, спричинених *S. aureus var. bovis*.

Дослідниками запропонована комбінована терапія, як засіб контролю резистентності патогенів, як до фагів, так і до антибіотиків. В ідеалі комбінація фаг-антибіотик повинна бути розроблена таким чином, щоб стійкість до одного агента підвищувала чутливість до іншого. Проте, синергічний протимікробний ефект комплексу фаг-антибіотик залежить від багатьох чинників, зокрема від концентрації, літичного циклу бактеріофагу, механізму дії антибіотика на бактеріальну клітину, тощо [517, 518].

Результати, описані в даному дослідженні вказують на те, що фаг *Phage SAvB14* ефективніше діяв на *S. aureus var. bovis* у сформованій біоплівці, ніж антибіотики, які були взяті у дослід. Фаг знищував у 1,99 рази ($p < 0,05$) більше бактерій, ніж за дії гентаміцину, у 1,97 рази ($p < 0,05$) більше від тетрацикліну, у 1,25 рази ($p < 0,05$) більше від енрофлоксацину та у 1,58 рази ($p < 0,05$) від цефтріаксону.

Комплексне одночасне застосування фагу та антибіотику також знижувало кількість життєздатних бактерій. Проте, ефективність одночасного застосування комплексу антибіотик-фаг була нижчою, ніж використання чистого фагу. Лише два з досліджених антибіотиків (гентаміцин і цефтріаксон) проявили синергічний ефект у поєднанні з *Phage SAvB14*, за їх одночасного застосуванні кількість *S. aureus* у складі біоплівки зменшилася у 39,81 рази ($p < 0,05$) порівнюючи із дією чистого фагу. Добру синергетичну дію проявив і цефтріаксон – він при одночасному застосуванні з фагом вбивав у 1,26 рази ($p < 0,05$) більше бактерій, ніж чистий фаг. Інші антибіотики не підвищували антибіоплівкову дію фагу. Зокрема, тетрациклін та енрофлоксацин залишали у 1,11 та 1,26 разів ($p < 0,05$) більше життєздатних клітин, ніж після дії самого бактеріофагу.

Наші дослідження також виявили, що найнижчий титр бактеріофагу ($\log 5,4 - 7,0$ БУО/мл) спостерігали при одночасному застосуванні фагу з антибіотиками. Отже, антибіотики проявляють антагоністичний вплив на

ефективність дії фагів. Це явище пояснюється вченими [189], які повідомляють про те, що білки є одними із структурних компонентів віріонів, а після застосування антибіотиків одним із механізмів може бути інгібування синтезу протеїнів та ДНК, що в подальшому може впливати на утворення нових фагових віріонів.

Обробка біоплівки фагами до введення антибіотиків дозволяє фагам швидко розмножуватися в бактеріально щільному середовищі біоплівки, що призводить до високої щільності фагів і відповідно порушення її матриці [199, 518]. Додавання антибіотиків до такої системи призводить до швидшого зменшення кількості бактерій завдяки глибшому проникненню антимікробних речовин. Однак, коли біоплівки піддаються спочатку дії антибіотиків, а потім фагів, популяції бактерій, які доступні для фагової інфекції, зменшуються, що може негативно впливати на кінетику розмноження бактеріофагів і, зрештою, на ефективність фаготерапії [92]. У дослідженнях [230] було експериментально доведено, що поетапне введення *Sb-1*, флуклоксациліну, цефазоліну або фосфоміцину покращувало антибіотикоплівкову активність у чотирьох з шести метицилін чутливих золотистих стафілококів, тоді як одночасний вплив демонстрував аналогічну або меншу синергію. Наші дослідження узгоджуються з раніше отриманими даними [230], коли під час поетапного застосування фагу та антибіотику відбувалося знищення біоплівки на 97,5 – 100 %.

Механізм дії антибіотиків на мікробну клітину також може впливати на взаємодію фаг-антибіотик при знищенні біоплівки. Тому нами були підібрані антибіотики з різним способом дії. За результатами досліджень найкращий синергізм взаємодії з фагом *Phage SAyB14* виявлений у гентаміцину. Аміноглікозиди – це інгібітори синтезу білка, які, швидше за все, будуть гальмувати продукцію фагів. Проте, дослідження взаємодії з цим класом антибіотиків виявили, що фаги володіють механізмом, який дозволяє обійти антибіотичне інгібування рибосоми і забезпечити синтез фагових білків [203]. З іншого боку, бактерицидні речовини прискорюють клітинне дихання з

наступною стимуляцією гідроксильних радикалів, які викликають загибель клітин [31]. Оскільки вважається, що реплікація фагу залежить від метаболічно активних бактерій, посилення клітинного дихання може стимулювати опосередковану фагову інфекцію [40]. Крім того, це явище можна пояснити тим, що аміноглікозиди можуть формувати популяцію бактерій з сильним агрегаційним фенотипом, котрі мають підвищену здатність утворювати біоплівки. Однак, ці популяції мікроорганізмів більш сприятливі до дії бактеріофагів, ніж їх батьківський штаб [329].

Децо нижчий рівень взаємодії проявив цефтріаксон. Він посилював вплив фагу на клітини у біоплівці у 1,6 рази ($p < 0,05$). Це можна пояснити тим, що цефалоспорини є інгібіторами клітинної стінки, які збільшують філаментацию клітин, а отже, викликають виробництво більшої кількості фагових частинок [431]. Також можливо, що комбінована дія фагових ферментів, які порушують цілісність бактеріальної мембрани разом з дією антибіотика може значно полегшувати лізис клітини.

Інші антибіотики взяті у дослід проявляли слабкий синергічний антибактеріальний ефект в поєднанні з бактеріофагом *Phage SAyB14*. Причиною цього можуть бути антагоністичні способи дії. Наприклад, антибіотик заважає процесу реплікації бактеріальної ДНК, або ж через знищення антибіотиком бактерій-господарів, які є необхідними для поширення фагової інфекції [154, 516].

Отже, за результатами досліджень встановлено, що найкращий синергічний ефект взаємодії *Phage SAyB14* з дослідженими антибіотиками спостерігався за їх поетапного застосування (спочатку бактеріофаг, потім антибіотик). Проте жодна комбінація фага з антибіотиком не призводила до повного знищення клітин стафілококів у біоплівці. Незважаючи навіть на добру синергію фагу з такими антибіотиками, як гентаміцин і цефтріаксон. Це вказує на роль біоплівки у захисті бактерій від дії антибіотиків та формуванні клітин персистентів.

Отримані результати лабораторних досліджень вказують на перспективність ефективного використання виділеного нами специфічного стафілококового бактеріофагу *Phage SAvB14* для лікування корів за маститу спричиненого *S. aureus var. bovis*.

Проведені дослідження вказують на те, що бактеріофаг *Phage SAvB14*, можна використати як діючу речовину при розробці внутрішньоцистрального засобу для лікування корів за стафілококового маститу. Встановлено, що *Phage SAvB14* зберігає свою активність у складі препарату протягом 394 доби за умови зберігання за температури (+2 - +6 °C), також не значно змінюється його титр, рН та стерильність протягом 12 місяців.

Однією з вимог до антибактеріального препарату, що виводиться на ринок, є підтвердження його безпеки [138, 140]. Незважаючи на те, що бактеріофаги успішно використовуються в світовій лікувальній практиці, в Україні недостатньо чинних нормативних документів для оцінки токсичності препаратів бактеріофагів. Ми визначити гостру та хронічну токсичність препарату на основі бактеріофагів Фагомаст для лікування маститу корів. При постановці дослідів керувалися вимогами ГОСТ 12.1.007-76 «Шкідливі речовини. Класифікація та загальні вимоги нешкідливості», принципами OECD «Керівні принципи щодо гострої токсичності хімічних речовин», наказом МОН «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» та стандартами GLP (Належна лабораторна практика).

Оцінка токсичності *in vivo*, а саме визначення гострої токсичності при одноразовому введенні та багаторазове застосування препарату мала на меті визначити потенційний розвиток індукованих бактеріофагами токсичних ефектів на живих організмах. При дослідженні токсичності ми білим мишам вводили максимально рекомендовані дози стандартом OECD препарату одноразово та протягом 14 днів. За результатами досліджень жодних змін при клінічному обстеженні тварин та змін при патологічному розтині не виявлено. Отриманні нами дані узгоджуються з наявними дослідженнями токсичності,

проведеними з іншими бактеріофагами. Так, тестування бактеріофагу Р100 щурам Wistar не викликало ніяких аномальних фізичних або поведінкових ознак [90]. Введення бактеріофага проти *salmonella* wks13 мишам BALB також не спричинювало жодних гострих побічних ефектів, пов'язаних з присутністю бактеріофагів в організмі [583]. Інші дослідницькі групи, які проводили більш довготривалі дослідження токсичності на мишах із використанням фагових коктейлів проти різних типів бактерій, також підтвердили загальне припущення, що введення фагів не має побічних ефектів на здоров'я тварин, їх життєві параметри та поведінку [551].

В результаті проведених досліджень встановлено, що навіть максимальна доза введення препарату (5 000 мг/кг) одноразово чи протягом 14 днів не викликала загибелі і гострої інтоксикації у піддослідних тварин. Отже, препарат Фагомаст можна вважати малотоксичним та відносити до IV класу згідно ГОСТ 12.1.007-76 та до V категорії згідно OECD. В подальшій наступних 3-х тижнів змін клінічного стану лабораторних тварин не спостерігали.

Препарати на основі бактеріофагів для лікування корів за маститу мають відповісти нормам, які зазвичай застосовуються до фармацевтичних продуктів. Проведена нами оцінка впливу фагового препарату Фагомаст на життєдіяльність інфузорії *Tetrachymena pyriformis* та його можливу подразнюючу дію на слизову оболонку очей кроликів показала, що за концентрації фагів від 10^4 до 10^9 БУО/мл у препараті зміни рухової активності та патологічних відхилень у клітинах інфузорій не було. При визначенні місцевої подразнюючої дії Фагомасту на слизових оболонках очей кролика видимих змін не спостерігали, як за внесення препарату за кількості фагових частин 10^4 БУО/мл, так і за максимального вмісту 10^9 БУО/мл. Отже, проведенні токсикологічні дослідження показали, що Фагомаст можна рекомендувати для подальших виробничих випробувань.

Під час розроблення фагового препарату необхідно розрахувати таку дозу кількість фагу у засобі, яка буде ефективною навіть при пасивному

фаговому лікуванні. Існує ряд досліджень, які вивчали бактерицидну активність бактеріофагів проти *S. aureus* у молоці. Молоко являє собою складне середовище, що складається з різних компонентів, таких як ліпіди, молочні білки (казеїни, сироваткові протеїни) та власна бактеріальна мікрофлора [228]. Дослідження фагів як альтернативного методу лікування стафілококового маститу у великої рогатої худоби вимагає дослідження бактерицидної активності фагів у молоці. З огляду на майбутнє внутрішньоцистернальне застосування препарату. У попередніх дослідженнях показано, що ліпіди та білки молочної сироватки пригнічують здатність фагів зв'язуватися з бактеріями-господарями [545]. Проте, дослідники [213] встановили, що додавання фагової суміші (*STALST29*, *EBLST11* та *EBLST27*) об'ємом 1 мл у концентрації $1,2 \times 10^9$ БУО/мл до сирого молока, зараженого *S. aureus*, спричиняло зменшення, в середньому на 83,6 % кількості бактерій через вісім годин інкубації. Водночас у пастеризованому молоці відмічали 100 % знищення клітин стафілококів фагом. Розглядаючи ці результати, слід зазначити, що здатність фагів зменшувати кількість бактерій *S. aureus* зберігається і в сирому молоці, тільки з дещо меншою ефективністю.

За результатами дослідження встановлено, що добру терапевтичну ефективність проявляють всі партії Фагомасту (81,8 – 92,8 %), проте тривалість лікування тварин була різною. При застосуванні препарату Фагомаст з титром фагів 10^9 БУО/мл вона коротша на 1 день ніж корів, яким вводили титр фагів 10^8 БУО/мл та на 1,5 днів порівняно з коровами першої групи, яким вводили титр фагів 10^7 БУО/мл. Таким чином, можна відзначити, що застосування вищої концентрації фагових віріонів призводить до кращого розподілу фагів у молочній залозі, а отже до поліпшення зв'язування фагів з клітинами-господарями та їх знищення.

Результати ефективності Фагомасту з титром бактеріофагів 10^8 та 10^9 БУО/мл підтверджена реакцією з мастидином, яка через 48 годин оцінена як сумнівна, а через 72 години – як негативна, як і при лікуванні антибіотиком. Вміст *S. aureus* у секреті корів через 12 годин після введення препарату з

титром фагів 10^9 БУО/мл знизився у 6 разів ($p < 0,05$), а через 48 годин у 40 разів ($p < 0,05$), і після 60 годин терапії взагалі не виділявся. При цьому титр бактеріофагів залишався на рівні 10^7 БУО/мл, і коли кількість чутливих бактерій знизилася до нуля знизився на 2 порядки. Аналізуючи отримані результати можна стверджувати, що у молочній залозі титр бактеріофагів підтримувався не лише при пасивному введенні препарату, але і при отриманні нових віріонів при знищенні бактерій. Дослідники [211] при вивченні здатності лігичного бактеріофагу *K* елімінувати внутріцистернальну інфекцію у корів під час лактації виявили його здатність розмножуватися у молочній залозі корови, при цьому зменшуючи вміст золотистого стафілококу. Висока ефективність застосування стафілококових бактеріофагів багаторазово підтверджена багатьма вченими на моделях тварин [95, 229, 282, 317].

Крім того, введення препарату через кожні 12 годин здатне підтримувати ефективну фагову інфекцію у місці запалення, що є ключовою вимогою при розробці бактеріофагових препаратів.

Отже, аналізуючи результати, отримані у цьому дослідженні, можна зробити висновок, що використання бактеріофагового препарату Фагомаст є альтернативою при лікуванні субклінічного стафілококового маститу у корів. Проте ефективність фагової терапії залежить від досягнення відносно високих титрів фагів *in situ*. Найкращим дослідним варіантом бактеріофагового препарату Фагомаст виявився з титром *Phage SAyB14* 10^9 БУО/мл.

При вивченні окремих показників крові за субклінічної форми маститу лактуючих корів, порівнюючи їх з даними фізіологічно здорових тварин та визначені терапевтичного впливу на ці показники бактеріофагового препарату Фагомаст можна стверджувати, що препарат не спричиняє змін гематологічних та біохімічних показників здорових корів, при його внутрішньоцистернальному введенні не спостерігаються клініко-патологічні зміни.

Аналізуючи отримані результати гематологічних показників крові корів з субклінічним маститом до лікування та після, слід відмітити позитивну

тенденцію при еритропоезі, кількість еритроцитів та гемоглобіну зросла на 7 та 18 % відповідно. На цьому фоні спостерігали зменшення кількості лейкоцитів на 10,5 %. Зміни даних показників слід розцінювати як зменшення запальних процесів в організмі корів під впливом препарату Фагомаст.

Біохімічні дослідження крові є необхідним компонентом при оцінці дії препаратів [402]. При визначенні вмісту загального білка в сироватці крові корів до та після застосування бактеріофагового препарату Фагомаст суттєвих змін не виявлено. Даний показник залишався в межах фізіологічних значень.

Патологічні зміни в організмі тварини призводять до зміни концентрації альбумінів та глобулінів у крові. Хоча референтні значення для білків сироватки крові корів можуть залежати від різних факторів, вимірювання їх концентрацій є корисним інструментом для оцінки фізіологічного стану тварини. Так, зміни концентрації альбуміну можуть свідчити про запальні стани [210], а концентрація загального сироваткового глобуліну запропонована як показник імунної відповіді тварини [486]. Крім того у клінічній патології велике значення надається співвідношенню альбумінів і глобулінів, яке використовується як маркер оцінки імунного статусу корови [535]. Нашими дослідженнями виявлено, що у корів з субклінічною формою маститу білковий коефіцієнт складав 0,5 одиниць. Схожі результати отримані [49], коли порівнювали 10 корів з субклінічним маститом та 10 здорових корів – співвідношення альбумінів до глобулінів складало 0,4 та 1,39 одиниць відповідно. Це можна пояснити тим, що збільшення кількості соматичних клітин в молоці демонструє зворотну залежність від концентрації альбуміну в сироватці крові. Висока концентрація альбуміну напряду пов'язана з низькою швидкістю прояву запальних процесів, і в разі потрапляння в організм збудника очікується зниження синтезу альбумінів в печінці, щоб сприяти виробленню глобулінів [210]. Після проведення лікування зі застосуванням Фагомасту спостерігали зменшення вироблення глобулінів (у 1,3 рази) та збільшення рівня альбумінів (у 1,2 рази), що свідчить про зменшення

запальних процесів в організмі корів, а отже підтверджує терапевтичну ефективність застосування даного препарату.

У даному дослідженні ми виявили підвищений рівень АСТ та АЛТ у сироватці крові маститних корів. Такі ж результати отримали і інші вчені [76, 206]. Підвищена активність цих ферментів при маститах може виникнути при руйнуванні спітеліальних клітин молочної залози та пошкоджених лейкоцитах. Вважається, що інтенсивність збільшення рівня цих ферментів прямо пропорційна важкості маститу [322]. При вивченні впливу препарату Фагомаст на кількість АСТ та АЛТ встановлено, що застосування для лікування даного препарату сприяло їх зменшенню та відновленню коефіцієнта де Рітиса, а отже позитивно вплинуло на організм корів. Схожі результати отримані нами при лікуванні маститів препаратами на основі антибіотиків.

Результати аналізу сироватки крові щодо вмісту мінеральних речовин виявили дещо знижений вміст Са та Р у корів, хворих на субклінічний мастит. Отримані нами результати відповідають висновкам [285], які повідомляють, що концентрації Са, Mg і Р були значно нижче при субклінічному маститі в порівнянні з контрольною групою (здорові тварини). Автори пояснюють дане явище тим, що надмірне виведення їх з організму відбувається через пошкоджені стінки судин при запаленні вимені.

Підвищення вмісту сечовини та креатиніну в сироватці крові корів може свідчити про запальні реакції в організмі [322]. Отримані нами дані підтверджують даний факт, рівень сечовини при субклінічному маститі складав $11,3 \pm 1,0$ – $12,3 \pm 1,1$ ммоль/л, а після лікування її вміст знизився в середньому в 2,5 рази ($p < 0,05$). Рівень креатиніну після лікування знизився в 1,5 рази ($p < 0,05$). Отже, можна відмітити позитивний вплив на організм корів лікувальної ефективності як бактеріофагового препарату Фагомаст так і антибіотиків.

Істотних відмінностей вмісту в сироватці крові глюкози, холестерину та лужної фосфатази в контрольній і дослідній групах не спостерігалось. Хоча

деякі дослідники повідомляють про зміни окремих біохімічних показників сироватки крові корів з ознаками субклінічного маститу. Проте ці коливання можуть бути викликані й іншими факторами, такими як порода тварини, режими утримання, період та стадія лактації, сезонність тощо [76].

Отже, результати гематологічних та біохімічних досліджень крові корів дозволяють прийти до висновку, що бактеріофаговий препарат Фагомаст проявляє позитивний вплив на організм та сприяє ефективному лікуванню маститу у корів не поступаючись препаратам на основі антибіотиків.

В останні роки використання літичних бактеріофагів як антимікробних засобів, є новою перспективною альтернативою в умовах зростаючої стійкості до антибіотиків [266, 319]. Нами вивчено терапевтичну ефективність розробленого нами фагового препарату Фагомаст порівнюючи її з ефективністю препаратів на основі антибіотиків, які використовувалися на трьох різних фермах при стандартних протоколах лікування субклінічного стафілококового маститу. Результати проведених досліджень показали, що лікувальний ефект при застосуванні препарату Фагомаст не поступається антибіотикам. Кількість чвертей вимені, які відновили функції склала 92,1 %. Ефективність застосування Фагомаст також підтверджена мікробіологічними дослідженнями з визначення кількості золотистого стафілококу до початку та після лікування. *S. aureus* після завершення лікування взагалі не виділявся зі свіжонадоеного молока. Успішне використання фагових препаратів при лікуванні маститів корів описані іншими дослідниками [229, 348, 404, 443, 546]. Так, вчені [264] при проведенні досліджень встановили, що препарат Фагодерм (ВРХ)®, який містить вірулентні активні бактеріофаги до більшості потенційно патогенних і умовно-патогенних культур, виділених з секрету молочних залоз при маститах, може альтернативно замінити антибактеріальні препарати, що застосовуються для профілактики маститів в умовах молочної ферми при запуску корів в сухостій – профілактична ефективність досягнута на рівні 87 %.

Отже, проведені дослідження підтверджують високу терапевтичну ефективність розробленого нами препарату бактеріофагу для лікування маститу у корів та дозволять підвищити екологічність отриманої продукції і мінімізувати обмежувальні заходи щодо випуску продукції при використанні антибактеріальних засобів.

У літературі зустрічаються дослідження, які вказують на те, що введення фагових препаратів шляхом інтрамамальної інфузії здатне викликати різку імунну відповідь, що проявляється збільшенням кількості соматичних клітин у молоці [102, 346]. Тому нами було визначено кількість соматичних клітин у секреті молочної залози корів при лікуванні фаговим препаратом Фагомаст. Встановлено, що через 5 днів після завершення лікування вміст соматичних клітин в молоці знизився у 16,8 разів, а отримане молоко відповідало вимогам ДСТУ 3662-2018 Молоко-сировина. Цілком ймовірно, що молочна залоза великої рогатої худоби здатна сильно реагувати на наявність бактеріофагу. Проте, проведені дослідження [211] показують збільшення кількості соматичних клітин лише у здорових корів, оброблених фагами. При цьому, кількість соматичних клітин повернулася до нормального рівня через 2 тижні після інфузії. На відміну від здорових корів, яким застосовували фагові препарати, у корів, хворих стафілококовим маститом, не спостерігалось значного зростання соматичних клітин після інфузії фагів. Це свідчить про те, що корови з ознаками маститу не так чутливі до введення фагу, як здорові.

Ефективність терапії при клінічній формі стафілококового маститу при застосуванні бактеріофагового препарату Фагомаст склала 71,4 %. При цьому період часу, протягом якого відбувається вибракування молока під час лікування клінічного маститу препаратом Фагомаст була в середньому в 1,5 раза менша, ніж за лікування такого маститу препаратами з вмістом антибіотиків.

Отже, терапевтична ефективність застосування розробленого нами бактеріофагового препарату Фагомаст становить 92,1 % при лікуванні корів за субклінічного маститу та 71,4 % при клінічній формі захворювання. При

цьому *S. aureus* через 5 днів після завершення лікування практично відсутній, а кількість соматичних клітин знижується у 16,8 разів порівняно з кількістю до початку лікування. Таким чином, підсумовуючи проведені дослідження необхідно відзначити, що ефективність лікування клінічного стафілококового маститу бактеріофаговим препаратом Фагомаст в загальному не поступається традиційним методам лікування із застосуванням препаратів-антибіотиків. Однак, значною перевагою під час фаготерапії маститу є значно менший термін вибраковування молока за рахунок відсутності у ньому залишкових кількостей антибіотиків, попередження розвитку антибіотикорезистентності у збудників захворювання та одержання екологічно безпечного молока.

Отже, поставлена перед нами мета: теоретично та експериментально обґрунтувати розробку фагового препарату літичного до збудника маститу корів *S. aureus var. bovis* та провести його комплексну терапевтичну оцінку – виконана повністю.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі експериментально розроблено бактеріофаговий препарат Фагомаст, який проявляє високий фармакологічно-літичний ефект до збудника маститу корів *S. aureus variant bovis*, та проведено його комплексну фармако-токсикологічну та клінічну оцінку. Підтверджено ефективність застосування Фагомасту як альтернативи антибіотикам для лікування корів за стафілококового маститу. Розроблено фармакологічні підходи для створення бактеріофагових препаратів. Виявлено формування стійкості у виділених збудників маститу до більшості антибіотиків та протимаститних препаратів.

1. Розроблено внутрішньостернальний препарат Фагомаст, діючою складовою якого є фаз *Phage SAyB14* з титром не менше 10^7 БУО/см³, який проявляє високу фармакологічно-літичну дію до збудника маститу у корів *S. aureus var. bovis*. Упродовж 12 місяців зберігання дослідних зразків препарату Фагомаст за температури від +2 до +6 °С не відбувається зниження титру, зміни рН середовища та стерильності.

2. Встановлено, що DI_{50} Фагомасту становить більше 5000 мг/кг живої маси тварин. Препарат не володіє кумулятивними, сенсибілізувальними властивостями, не викликає подразнення, нетоксичний при пероральному введенні в живий організм та не впливає на зміну морфологічних показників крові лабораторних тварин. Не спричинює місцевоподразнювальну дію слизових оболонок очей кролика. Встановлено, що за концентрації фазів від 10^4 до 10^9 БУО/см³ у препараті зміни рухової активності та патологічних відхилень у клітинах інфузорій не спостерігається. За встановленими фармакологічними, токсикологічними та клінічними ознаками препарат Фагомаст віднесено до IV класу (малотоксичні) безпечності.

3. При визначенні оптимального титру фагових віріонів у препараті встановлено, що за введення інтрастернально коровам за субклінічного маститу Фагомасту з вмістом $10^7, 10^8, 10^9$ БУО/см³ два рази на добу, титр

бактеріофагів залишається на рівні 10^{10} БУО/ cm^3 упродовж усього періоду лікування. При введенні препарату здоровим тваринам не виявляється збільшення кількості соматичних клітин в молоці, а отже, можна вважати, що дослідний препарат не спричинює подразнення.

4. Встановлено, що введення здоровим тваринам Фагомасту не впливає на гематологічні та біохімічні показники крові та не спричинює видимих клініко-патологічних змін. При застосуванні Фагомасту коровам за маститу відзначається відновлення показників крові до фізіологічних значень упродовж 5 діб. За цих умов динаміка змін морфологічних і біохімічних показників крові у тварин, яким застосовували бактеріофаг, була практично аналогічна як у корів, яких лікували антибіотиками, різниця між показниками не була вірогідна.

5. Встановлено, що найкращий синергічний ефект взаємодії *Phage SAvB14* з антибіотиками спостерігається за їх поетапного застосування (спочатку бактеріофаг, потім антибіотик). За одночасного застосування *Phage SAvB14* з гентаміцином кількість життєздатних стафілококів у біоплівці зменшується в 39,8 рази ($p < 0,05$), а при поетапному – не виділяються взагалі. За одночасного впливу на стафілококові біоплівки *Phage SAvB14* та тетрацикліну не виявляється синергічного ефекту, водночас при поетапному внесенні *Phage SAvB14* та антибіотику проявляється виражений бактерицидний ефект – кількість бактерій була у 6,31 рази ($p < 0,05$) меншою, ніж за одночасного застосування. Під час маститу слід використовувати *Phage SAvB14* з антибіотиками за поетапного введення у проміжку 12 год.

6. Фармакологічна ефективність застосування Фагомасту при лікуванні корів за субклінічного маститу становила 92,1 %, за цих умов *S. aureus* через 5 діб після завершення лікування не виділявся, а кількість соматичних клітин знижувалася у 16,8 рази до $250,1 \pm 22,3$ тис./ cm^3 . Ефективність застосування Фагомасту при клінічній формі становила 71,4 %. Препарат Фагомаст не поступається традиційним методам лікування із застосуванням антибіотиків. Одночасно, деякий період часу, протягом якого відбувається вибракування

молока за лікування маститу Фагомастом, у середньому в 1,5 рази ($p < 0,05$) менший, ніж за лікування препаратами з вмістом антибіотиків.

7. Виявлено, що найвища чутливість планктонних бактерій збудників маститу (стрептококів і стафілококів) була до цефтріаксону і доксицикліну (100 – 80,9 %), а найменша до бензилпеніциліну (32,3 – 45,4 %). З досліджених 25 протимаститних внутрішньоцистернальних препаратів лише 27,3 % проявляли бактерицидну дію до усіх виділених культур *S. aureus* і *S. agalactiae*. До 22,7 % препаратів патогенні бактерії виявилися взагалі не чутливі, а до решти препаратів чутливими були від 14,3 до 83,3 % виділених патогенів. Відсоток штамів *S. aureus* на молочних фермах, стійких до метициліну становить, в середньому 26,8 %.

8. Встановлено, що плівкоутворювальні форми збудників маститу стійкіші до антибактеріальних препаратів, ніж їх планктонні форми. Мінімальна бактерицидна концентрація антибіотиків для знищення бактерій у біоплівці була у 7,5 разів ($p < 0,05$) вищою, ніж для знищення їх планктонних форм. Найефективнішими щодо біоплівкових форм бактерій виявилися антибіотики енрофлоксацин, цефтріаксон і доксициклін, які практично повністю знищували бактерії у біоплівках. Одночасно, після дії антибіотиків пеніцилінів, аміноглікозидів і макролідів кількість бактерій, що вижили становила близько 5,3 Іг КУО/см² площі біоплівки.

9. Ідентифіковано та первинно задепоновано штам *S. aureus var. bovis 1491 f*, який є типовим збудником маститу корів і використаний в якості культури для нарощування титрів стафілококових фагів, які циркулюють на молочних фермах. Встановлено, що вплив фізичних (ультрафіолетових променів) та хімічних (мітоміцин С) чинників на *S. aureus var. bovis 1491 f* не спричинює індукцію профагу, а застосування методу багатоступеневої фільтрації є оптимальним для очищення стафілококових фагів від бактеріальних клітин.

10. Виділено фаги, специфічні щодо *S. aureus var. bovis*: Phage SA_vB07, Phage SA_vB08, Phage SA_vB12, Phage SA_vB14. До того ж, серед досліджених

штамів *Phage SAvB14* має короткий латентний період (до 35 хвилини), за цих умов кількість активних віріонів збільшувалась на 8 порядків. Встановлено, що *Phage SAvB14* стійкіший на 15,6 – 33,9 % до впливу високих температур, порівняно з іншими фагами, стабільний за рН – 6 – 8 од середовища, та витримує концентрацію хлороформу 10 % протягом 45 хв. Оптимальними умовами для зберігання фагу *Phage SAvB14* визначено температурний режим у межах 4 та 8°C.

11. Визначено, що інтенсивність фармакологічно-літичної активності фагів залежала від кількості чутливих бактеріальних клітин у об'ємі живильного середовища. Через 12 годин впливу *Phage SAvB14* з титром 10^{-8} БУО/см³ на *S. aureus var. bovis* з вмістом 10^5 КУО/см³, кількість бактерій зменшилася у 1,5 раза ($p < 0,05$), порівняно з дією фагу 10^{-6} БУО/см³. Упродовж 24 год контакту фагу з клітинами *S. aureus var. bovis* у суспензії кількість бактерій зменшилася до $7,8 \pm 0,3 \cdot 10^2$ КУО/см³. Для отримання ефективної фармакологічної дії після застосування Фагомасту під час лікування корів за маститу, спричиненого *S. aureus var. bovis*, рекомендується використовувати фаголізат із титром не менше 10^{-7} БУО/см³.

12. Встановлено, що для ефективного використання фагів потрібно враховувати біологічне походження штамів стафілококів. Так, *Phage SAvB14* лізус 92,7±8,3% культур золотистого стафілококу, виділеного з секрету молочної залози корів. Одночасно, дослідний фаг не впливав на культури золотистого стафілококу, виділеного з біотопу людини. Фаг *Phage SAvB14* здатний інфікувати від 48,7±4,3 % до 62,1±4,8 % такі види стафілококів, як *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* та *S. xylosus*, що вказує про його полівалентність. Виявлено, що фармакологічно-літична активність промислових фагових препаратів Інтестіфаг® та Стафілококовий бактеріофаг® спрямована, в основному, на *S. aureus var. hominis*. Промислові бактеріофаги взагалі не лізують культури, які виділені від корів, хворих маститом.

13. За впливу протягом 32 год *Phage SAvB14* на молоді 24-годинні біоплівки *S. aureus var. bovis* відзначається зменшення щільності біоплівки на $34,5 \pm 0,7$ %. Також виявляється зменшення кількості клітин *S. aureus* у біоплівці з $1,5 \pm 0,3 \cdot 10^9$ до $1,3 \pm 0,2 \cdot 10^3$ КУО/см³ змиву. Одночасно, за впливу бактеріофагу на зрілі 72-годинні біоплівки встановлена деградація $77,5 \pm 1,4$ % біоплівки. За цих умов із біоплівки не виділяються життєздатні клітини *S. aureus*. Це вказує про високу літичну активність бактеріофагу відносно зрілих біоплівкових бактерій та можливість його застосування за хронічних стафілококових інфекцій.

14. Встановлено, що на молочних фермах маститом хворіють, у середньому, 35,7 % корів упродовж року, за цих умов субклінічну форму маститу діагностували у 29,4% корів, а клінічну – в 4,6 рази ($p < 0,05$) менше (6,4 %). За субклінічної форми маститу у період лактації найчастіше виділяються бактерії роду *Streptococcus spp.* (47,7 %) та *Staphylococcus spp.* (45,5 %), що вказує про їх головну етіологічну роль у виникненні маститу. Виявлено, що основним збудником стафілококового маститу є *S. aureus subsp. aureus*.

15. Серед збудників як гострої, так і хронічної форм маститу найбільшою плівкоутворювальною здатністю володіли штами *S. aureus*, які у 1,4 – 1,5 рази ($p < 0,05$) частіше утворювали мікробну біоплівку, ніж штами *S. agalactiae* і *S. dysgalactiae*. За цих умов збудники *S. aureus*, які виділяються за субклінічного маститу та за носійства на шкірі в 2,0 рази ($p < 0,05$) більше формували біоплівки, ніж за клінічної форми маститу.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для забезпечення ефективної фаготерапії при профілактиці та лікуванні корів за маститу різних форм, спричинених *S. aureus var. bovis*, необхідно враховувати наступні рекомендації:

1. Проводити комплексну діагностику запалення вимені у корів, враховуючи патогенні властивості збудників, їх антибіотикостійкість та чутливість до комерційних фагових препаратів.

2. Для виділення та дослідження виключно високолітичних бактеріофагів, специфічних щодо *S. aureus var. bovis*, використовувати методичні рекомендації «Виділення бактеріофагів *S. aureus var. bovis* на молочних фермах та визначення їх літичної активності», затверджені науково-методичною радою Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (протокол № 4 від 25.05.2022 року).

3. При створенні препарату на основі бактеріофагів для лікування корів за маститу необхідно враховувати біологічне походження штамів фагів, їх літичну активність, стійкість до впливу факторів навколишнього середовища, спектр антибактеріальної дії, антибіоплівкову активність та взаємодію з іншими антибактеріальними препаратами.

4. Для профілактики та лікування маститу використовувати внутрішньоцистернальний препарат Фагомаст ТУ У 21.2–22769675–001:2022 відповідно до методичних рекомендацій «Лікування корів за маститу з використанням бактеріофагового препарату Фагомаст», затверджені науково-методичною радою Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (протокол № 4 від 25.05.2022 року).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів, ізольованих з молока / О. В. Гадзевич та ін. *Світ медицини та біології*. 2019. Вип. 3, № 69. С. 245–250.
2. Балим Ю. П. Морфометричні показники ендометрію корів після комплексного лікування гнійно-катарального ендометриту з застосуванням біостимулятора селеран. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*. 2014. Вип. 6. С. 184–185.
3. Бердник В. П., Ракітіна А. І., Завалій М. Ф. Клінічний стан та показники крові корів, хворих на прихований мастит, до та після застосування розчину полтавського бішофіту. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2021. Вип. 1. С. 262–268. DOI: <https://doi.org/10.31210/visnyk2021.01.33>
4. Білик Р. І., Ткачук С. А. Вимоги до ветеринарного обслуговування органічних молочних господарств. *Ветеринарна медицина України*. 2015. Вип. 3. С. 29–33.
5. Вакцина “мультибовісан” асоційована інактивована концентрована проти пневмоентеритів, ендометритів, маститів, анаеробної ентеротоксемії, некротичного гепатиту, зляккісного набряку, колибактеріозу, сальмонельозу : пат. 75659 Україна. № u201206192 ; заявл. 23.05.2012 ; опубл. 10.12.2012, Бюл. № 23. 5 с.
6. Вивчення та аналізування небезпечних чинників щодо виникнення маститу в корів на молочних фермах / В. Касянчук та ін. *Ветеринарна медицина*. 2010. Вип. 93. С. 201–210.
7. Виявлення гена резистентності до метициліну в ізолятах *S. aureus*, виділених із молока корів / В. В. Касянчук та ін. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. Вип. 32, № 1. С. 107–115.
8. Вознюк О. І. Перспективи розвитку виробництва органічних молочних продуктів в Україні та світі. *Аграрна наука та харчові технології*. 2017. Вип. 1. С. 187–198.

9. Вплив препарату фагомаст на життєдіяльність інфузорій та слизову оболонку очей кроликів / Ю. В. Горюк та ін. *Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка*. 2022. Вип. 35. С. 55–62.
10. Горюк Ю. В. Визначення ефективності застосування препарату Фагомаст з різними титрами *Phage SAvB14*. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2021. № 2. С. 57–64. DOI: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-168-2-57-64>
11. Горюк Ю. В. Терапевтична ефективність бактеріофагового препарату «фагомаст» для лікування субклінічного маститу корів. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2021. № 3. С. 204–209. DOI: <https://doi.org/10.31210/visnyk2021.03.25>
12. Динаміка морфологічних та біохімічних показників крові корів хворих маститом при застосуванні фагового препарату Фагомаст / Ю. Горюк та ін. *Аграрний вісник Причорномор'я*. 2021. Вип. 100. С. 44–51. DOI: <https://doi.org/10.37000/abbsl.2021.100.09>
13. Довбня А. О., Березовський А. В., Фотіна Г. А. Динаміка захворювання корів на мастит в умовах промислового виробництва молока. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького*. 2019. Вип. 21, № 96. С. 171–176. DOI: [10.32718/nvlvet9630http://nvlvet.com.ua](https://doi.org/10.32718/nvlvet9630http://nvlvet.com.ua)
14. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І. Я. Коцюмбас та ін. ; ред. І. Я. Коцюмбас. Львів : Тріада плюс, 2006. 360 с.
15. Жук Ю. В., Сухонос В. П., Штеплюк О. М. Комплексне лікування корів за субклінічного маститу з використанням препарату мастилін. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва*. 2017. Вип. 273. С. 266–274.
16. Зміни вмісту складових молока при захворюванні корів на мастит / Ю. І. Склярєнко та ін. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2013. Вип. 1, № 22. С. 66–68.

17. Кругляк О. В. Організація ефективного виробництва органічної продукції молочного скотарства. *Збалансоване природокористування*. 2017. Вип. 4. С. 30–37.
18. Коцюмбас І. Я., Гунчак В. М., Стецько Т. І. Проблеми використання антимікробних препаратів для стимулювання росту продуктивних тварин та альтернативи їх застосуванню. *Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок*. 2013. Т. 14, № 3-4. С. 381–389.
19. Про основні принципи та вимоги до органічного виробництва, обігу та маркування органічної продукції : Закон України від 10.07.2018 р. № 2496–VIII : станом на 5 серп. 2021 р.
URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2496-19#Text>
20. Роман Л. Г. Трансдермін – новий протимаститний йодовмісний препарат. *Міжвідом. темат. наук. зб.* 2018. Вип. 104. С. 284–289.
21. Сачук Р. М. Ефективність препарату на основі ефірних олій та масляного розчину хлорофіліпту при гіперкератозі сосків вимені у корів. *Ветеринарна біотехнологія*. 2019. Т. 34. С. 140–146.
22. Специфічна профілактика маститів, ендометритів та інфекційної патології відтворення / В. П. Риженко та ін. *Ветеринарна біотехнологія*. 2011. Вип. 20. С. 151–156.
23. Стравський Я. С., Шуманський Ю. І. Тканинний препарат СТП у профілактиці субклінічного маститу корів, патології отелення та післяотельного періоду. *Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок*. 2013. Вип. 14, № 3–4. С. 96–100.
24. Строяновська Л., Супрович Т. Поширення та етіологія маститів у фермерському господарстві. *Аграрний вісник Причорномор'я*, 2021. Вип. 100. С. 16–21. DOI: <https://doi.org/10.37000/abbsl.2021.100.04>

25. Титух Я. В. Моніторинг різних форм маститу у господарствах Сумської області. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2021. Вип. 1, № 52. С. 45–50.
26. Харенко М. І., Байдевятова Ю. В. Застосування препарату тіотриазолін при терапії корів з серозним маститом. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького*. 2008. Вип. 10, № 2–1(37). С. 396–399.
27. Чепурна В. Фактори природної резистентності при субклінічному маститі за дії ліпосомального препарату. *Аграрний вісник Причорномор'я*. 2021. № 99. DOI: <https://doi.org/10.37000/abbsl.2021.99.04>
28. 3D printed bioceramic for phage therapy against bone nosocomial infections / F. Bouchart et al. *Materials science and engineering: C*. 2020. Vol. 111. P. 110840. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110840>
29. A bacteriocin-based antimicrobial formulation to effectively disrupt the cell viability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms / C. Kranjec et al. *NPJ biofilms and microbiomes*. 2020. Vol. 6, no. 1. P. 1–13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00166-4>
30. A biosurfactant-inspired heptapeptide with improved specificity to kill MRSA / Y. Liu et al. *Angewandte chemie international edition*. 2017. Vol. 56, no. 6. P. 1486–1490. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201609277>
31. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics / M. A. Kohanski et al. *Cell*. 2007. Vol. 130, no. 5. P. 797–810. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
32. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation / S. Stepanović et al. *Journal of microbiological methods*. 2000. Vol. 40, no. 2. P. 175–179. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)
33. A novel lactobacilli-based teat disinfectant for improving bacterial communities in the milks of cow teats with subclinical mastitis / J. Yu et al. *Frontiers in microbiology*. 2017. Vol. 8. P. 1–9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01782>

34. A phage protein that inhibits the bacterial ATPase required for type IV pilus assembly / I. Y. Chung et al. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2014. Vol. 111, no. 31. P. 11503–11508. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1403537111>
35. A qualitative study on antibiotic use and animal health management in smallholder dairy farms of four regions of India / G. Sharma et al. *Infection ecology & epidemiology*. 2020. Vol. 10, no. 1. P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1080/20008686.2020.1792033>
36. Abedon S. Ecology of anti-biofilm agents I: antibiotics versus bacteriophages. *Pharmaceuticals*. 2015. Vol. 8, no. 3. P. 525–558. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph8030525>
37. Abedon S. Phage therapy pharmacology. *Advances in applied microbiology*. 2011. P. 1–40. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387044-5.00001-7>
38. Abedon S. T. Commentary: communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Frontiers in microbiology*. 2017. Vol. 8. P. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00983>
39. Abedon S. T. Lysis from without. *Bacteriophage*. 2011. Vol. 1, no. 1. P. 46–49. DOI: <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.13980>
40. Abedon S. T. Phage-Phage, Phage-Bacteria, and Phage-Environment Communication. *Biocommunication of phages*. Cham, 2020. P. 23–70. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-45885-0_2
41. Abedon S. T. Spatial Vulnerability: Bacterial Arrangements, Microcolonies, and Biofilms as Responses to Low Rather than High Phage Densities. *Viruses*. 2012. Vol. 4, no. 5. P. 663–687. Doi: <https://doi.org/10.3390/v4050663>
42. Activity of Specialized Biomolecules against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria / T. D. Tavares et al. *Antibiotics*. 2020. Vol. 9, no. 6. P. 314. Doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060314>

43. Adapting a phage to combat phage resistance / E. Laanto et al. *Antibiotics*. 2020. Vol. 9, no. 6. P. 291. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060291>
44. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus* / T. J. Foster et al. *Nature reviews microbiology*. 2014. Vol. 12, no. 1. P. 49–62. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
45. Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 β and IL-8 gene expression / C. Beecher et al. *Journal of Dairy Research*. 2009. Vol. 76, no. 3. P. 340–348.
46. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review / K. Sharun et al. *Veterinary quarterly*. 2021. Vol. 41, no. 1. P. 107–136. Doi: <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
47. Akers R. M., Nickerson S. C. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2011. Vol. 16, no. 4. P. 275–289. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9231-3>
48. Alkyl Gallates, Intensifiers of β -Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / H. Shibata et al. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005. T. 49, № 2. C. 549–555. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.49.2.549-555.2005>
49. Alteration in the activity of blood and milk leukocytes together with the serum enzyme profile during sub-clinical mastitis in cross-bred cows / S. Gain et al. *Indian Journal of Animal Science*. 2015. Vol. 85. P. 856–860.
50. Altered leukocyte responsiveness in dairy cows with naturally occurring chronic *Staphylococcus aureus* mastitis / H. Nagahata et al. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2011. Vol. 7. P. 885–900. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0379>

51. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus* / M. H. Fabres–Klein et al. *BMC veterinary research*. 2015. Vol. 11, no. 1. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0319-7>
52. An observational cohort study on antimicrobial usage on dairy farms in Quebec, Canada / H. Lardé et al. *Journal of Dairy Science*. 2021. Vol. 104, no. 2. P. 1864–1880. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18848>
53. Analysis of different parameters affecting diffusion, propagation and survival of staphylophages in bacterial biofilms / S. González et al. *Frontiers in microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 1–16. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02348>
54. Antibacterial effect of plant–derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro / S. A. Baskaran et al. *Journal of dairy science*. 2009. Vol. 92, no. 4. P. 1423–1429. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1384>
55. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* / W. R. Li et al. *Biometals*. 2011. Vol. 24, no. 1. P. 135–141.
56. Antibacterial effects and resistance induction of silver and gold nanoparticles against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis and the potential toxicity in rats / A. Elbehiry et al. *MicrobiologyOpen*. 2018. Vol. 8, no. 4. P. e00698. DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.698>
57. Anti–biofilm activity of hydromethanolic plant extracts against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis / F. Gomes et al. *Heliyon*. 2019. Vol. 5, no. 5. P. e01728. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01728>
58. Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis / A. Asli et al. *Plos one*. 2017. Vol. 12, no. 5. P. e0176988. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176988>
59. Antibiotic use in organic and non–organic Swedish dairy farms: a comparison of three recording methods / G. O. Antillón et al. *Frontiers in veterinary science*. 2020. Vol. 7. P. 568881. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.568881>

60. Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis / S. Ksouri et al. *Journal de mycologie médicale*. 2017. Vol. 27, no. 2. P. 245–249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.03.004>
61. Antimicrobial activity of propolis extract fractions against *Staphylococcus* spp. isolated from goat mastitis / H. C. D. Santos et al. *Pesquisa veterinária brasileira*. 2019. Vol. 39, no. 12. P. 954–960. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5940>
62. Antimicrobial Activity of the Circular Bacteriocin AS-48 against Clinical Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* / C. Velázquez-Suárez et al. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10, no. 8. P. 925. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080925>
63. Antimicrobial effect of zophobas morio hemolymph against bovine mastitis pathogens / M. Du et al. *Microorganisms*. 2020. Vol. 8, no. 10. P. 1488. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101488>
64. Antimicrobial effects of conditioned medium from amniotic progenitor cells in vitro and in vivo: toward tissue regenerative therapies for bovine mastitis / A. Lange-Consiglio et al. *Frontiers in veterinary science*. 2019. Vol. 6. P. 443. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00443>
65. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Streptococcus* isolated from dairy cows with mastitis in China / X. Y. Tian et al. *Microbial pathogenesis*. 2019. Vol. 131. P. 33–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.035>
66. Antimicrobial resistance genes in bacteria from animal-based foods / I. de Alcântara Rodrigues et al. *Advances in Applied Microbiology*. 2020. Vol. 112. P. 143–183. Doi: <https://doi.org/10.1016/bs.aamb.2020.03.001>
67. Antimicrobial resistance genes in raw milk for human consumption / A. G. Tóth et al. *Scientific reports*. 2020. Vol. 10, no. 1. P. 1–7. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63675-4>

68. Antimicrobial resistance of staphylococcus aureus isolates from dairy cows and genetic diversity of resistant isolates / R. D. Abdi et al. *Foodborne pathogens and disease*. 2018. Vol. 15, no. 7. P. 449–458. DOI: <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2362>
69. Antimicrobial resistance pattern and virulence profile of *S. aureus* isolated from household cattle and buffalo with mastitis in Egypt / M. El-Ashker et al. *Veterinary microbiology*. 2020. Vol. 240. P. 108535. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108535>
70. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results / V. Thomas et al. *International journal of antimicrobial agents*. 2015. Vol. 46, no. 1. P. 13–20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.013>
71. Antimicrobial susceptibility of nine udder pathogens recovered from bovine clinical mastitis milk in Europe 2015–2016: VetPath results / F. El Garch et al. *Veterinary microbiology*. 2020. Vol. 245. P. 108644. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108644>
72. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows / B. Bengtsson et al. *Veterinary microbiology*. 2009. Vol. 136, no. 1–2. P. 142–149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.024>
73. Antimicrobial susceptibility profile of bacteria in mastitis cow milk samples / G. C. Nadăș et al. *Bulletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine cluj–napoca. Veterinary medicine*. 2021. Vol. 78, no. 1. P. 96. DOI: <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:2021.0005>
74. Antimicrobial treatment of clinical mastitis in the eastern United States: The influence of dairy farmers' mastitis management and treatment behavior and attitudes / J. Kayitsinga et al. *Journal of Dairy Science*. 2017. Vol. 100, no. 2. P. 1388–1407. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11708>
75. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal

bacterial pathogens / M. T. Sweeney et al. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018. Vol. 73, no. 6. P. 1460–1463. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dky043>

76. Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis / H. Babaei et al. *Veterinary research communications*. 2007. Vol. 31, no. 4. P. 419–425. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-007-3539-x>

77. Association between udder inflammation and glycosidase activities and free sugar levels in bovine milk / A. V. Sunds et al. *International Dairy Journal*. 2021. Vol. 120. P. 105093. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105093>

78. Association between vancomycin trough concentrations and duration of methicillin-resistant staphylococcus aureus bacteremia in children / A. J. Hsu et al. *Journal of the pediatric infectious diseases society*. 2017. Vol. 7, no. 4. P. 338–341. DOI: <https://doi.org/10.1093/jpids/pix068>

79. Association of california mastitis test scores with intramammary infection status in lactating dairy cows admitted to a veterinary teaching hospital / S. A. Kandeel et al. *Journal of veterinary internal medicine*. 2017. Vol. 32, no. 1. P. 497–505. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvim.14876>

80. Association of Staphylococcal Populations on Teatcups of Milking Parlours with Vaccination against Staphylococcal Mastitis in Sheep and Goat Farms / C. K. Michael et al. *Pathogens*. 2021. Vol. 10, no. 4. P. 385. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10040385>

81. Associations between properties linked with persistence in a collection of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis / M. Bardiau et al. *Veterinary microbiology*. 2014. Vol. 169, no. 1–2. P. 74–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.010>

82. Awandkar S. P., Kulkarni M. B., Khode N. V. Bacteria from bovine clinical mastitis showed multiple drug resistance. *Veterinary Research Communications*. 2022. Vol. 46, P. 147–158. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09838-8>

83. Azeredo J., Sutherland I. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2008. Vol. 9, no. 4. P. 261–266. DOI: <https://doi.org/10.2174/138920108785161604>
84. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies / C. de la Fuente–Núñez et al. *Current opinion in microbiology*. 2013. Vol. 16, no. 5. P. 580–589. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>
85. Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections / R. Srinivasan et al. *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12. P. 1106. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676458>
86. Bactericidal properties of the «Geocid» preparation / V. L. Kovalenko et al. *Naukovì dopovidì Nacional'nogo universitetu bìoresursiv ì prirodkoristuvannâ Ukraïni*. 2019. Vol. 1, no. 1. P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.01.025>
87. Bacteriocins and bacteriophages: therapeutic weapons for gastrointestinal diseases? / L. R. Lopetuso et al. *International journal of molecular sciences*. 2019. Vol. 20, no. 1. P. 183. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20010183>
88. Bacteriophage – A Promising Alternative Measure for Bacterial Biofilm Control / F. Tian et al. *Infection and Drug Resistance*. 2021. Vol. 14. P. 205–217. DOI: <https://doi.org/10.2147/idr.s290093>
89. Bacteriophage and probiotics both enhance the performance of growing pigs but bacteriophage are more effective / K. H. Kim et al. *Animal feed science and technology*. 2014. Vol. 196. P. 88–95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.012>
90. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application / R. M. Carlton et al. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 2005. Vol. 43, no. 3. P. 301–312. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.08.005>

91. Bacteriophage Sb-1 enhances antibiotic activity against biofilm, degrades exopolysaccharide matrix and targets persisters of *Staphylococcus aureus* / T. Tkhilaishvili et al. *International journal of antimicrobial agents*. 2018. Vol. 52, no. 6. P. 842–853. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.006>
92. Bacteriophage therapeutics: a primer for clinicians on phage-antibiotic combinations / T. Morrisette et al. *Pharmacotherapy: the journal of human pharmacology and drug therapy*. 2020. Vol. 40, no. 2. P. 153–168. DOI: <https://doi.org/10.1002/phar.2358>
93. Bacteriophage treatment of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a multispecies biofilm: a potential biocontrol strategy for healthcare facilities / A. J. Santiago et al. *AIMS microbiology*. 2020. Vol. 6, no. 1. P. 43–63. DOI: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020003>
94. Bacteriophage utilization in animal hygiene / S. Klopatek et al. *Bacteriophages*. Cham, 2018. P. 1–28. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_30-1
95. Bacteriophage Φ SA012 Has a Broad Host Range against *Staphylococcus aureus* and Effective Lytic Capacity in a Mouse Mastitis Model / H. Iwano et al. *Biology*. 2018. Vol. 7, no. 1. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology7010008>
96. Bacteriophage-Derived Depolymerases against Bacterial Biofilm / G. Topka-Bielecka et al. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10, no. 2. P. 175. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020175>
97. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process / A. Latka et al. *Applied microbiology and biotechnology*. 2017. Vol. 101, no. 8. P. 3103–3119. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8224-6>
98. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens / J. Mahony et al. *Current opinion in biotechnology*. 2011. Vol. 22, no. 2. P. 157–163. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.008>

99. Bacteriophages as potential treatment for urinary tract infections / W. Sybesma et al. *Frontiers in microbiology*. 2016. Vol. 7. P. 1–16. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00465>
100. Bacteriophages in water pollution control: advantages and limitations / M. Ji et al. *Frontiers of environmental science & engineering*. 2020. Vol. 15, no. 5. P. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1378-y>
101. Bacteriophages: potential biocontrol agents and treatment options for bacterial pathogens / N. Harshitha et al. *Clinical microbiology newsletter*. 2022. Vol. 44, no. 5. P. 41–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2022.02.002>
102. Bacteriophages' action against mastitis-causing bacteria / L. N. Barbosa et al. *Research, society and development*. 2020. Vol. 9, no. 10. P. e1849108541. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8541>
103. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation / C. Cucarella et al. *Journal of bacteriology*. 2001. Vol. 183, no. 9. P. 2888–2896. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001>
104. Barbano D. M., Ma Y., Santos M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of dairy science*. 2006. Vol. 89. P. 15–19. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72360-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72360-8)
105. Barbu E. M., Cady K. C., Hubby B. Phage therapy in the era of synthetic biology. *Cold spring harbor perspectives in biology*. 2016. Vol. 8, no. 10. P. a023879. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023879>
106. Barkema H. W., Schukken Y. H., Zadoks R. N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of dairy science*. 2006. Vol. 89, no. 6. P. 1877–1895. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1)
107. Barkema H. W., Schukken Y. H., Zadoks R. N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of dairy science*. 2006. Vol. 89, no. 6. P. 1877–1895. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72256-1)

108. Basnet S. K., Manevska–Tasevska G., Surry Y. Explaining the Process for Conversion to Organic Dairy Farming in Sweden: An Alternative Modelling Approach. *German Journal of Agricultural Economics*. 2018. Vol. 67(670–2021–573). P. 14–30. DOI: [10.22004/ag.econ.309947](https://doi.org/10.22004/ag.econ.309947)
109. Becker S. C., Foster–Frey J., Donovan D. M. The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA. *FEMS microbiology letters*. 2008. Vol. 287, no. 2. P. 185–191. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01308.x>
110. Behavior of Foodborne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Mixed–Species Biofilms Exposed to Biocides / V. Oxaran et al. *Applied and environmental microbiology*. 2018. Vol. 84, no. 24. P. 1–18. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02038-18>
111. Behzadi P., Baráth Z., Gajdács M. It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug–resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10, no. 1. P. 1–29. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010042>
112. *Bergey's manual of systematic bacteriology : volume 3: the firmicutes* / G. Garrity et al. Springer, 2019. 1502 p.
113. Bertozzi Silva J., Storms Z., Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS microbiology letters*. 2016. Vol. 363, no. 4. P. 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
114. Biodistribution of liposome–encapsulated bacteriophages and their transcytosis during oral phage therapy / J. Otero et al. *Frontiers in microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00689>
115. Biofilm applications of bacteriophages / C. Milho et al. *Bacteriophages*. Cham, 2019. P. 1–35. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_27-1
116. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin–resistance in Agr–type II strains /

M. B. Melchior et al. *Veterinary microbiology*. 2009. Vol. 137, no. 1–2. P. 83–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.004>

117. Biofilm formation as a microbial strategy to assimilate particulate substrates / P. Sivadon et al. *Environmental microbiology reports*. 2019. Vol. 11, no. 6. P. 749–764. DOI: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12785>

118. Biofilm formation in bovine mastitis pathogens and the effect on them of antimicrobial drugs / Y. Horiuk et al. *Independent journal of management & production*. 2019. Vol. 10, no. 7. P. 897. DOI: <https://doi.org/10.14807/ijmp.v10i7.1012>

119. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes / E. Thiran et al. *Journal of dairy science*. 2018. Vol. 101, no. 2. P. 1000–1012. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13696>

120. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies / F. Sun et al. *Future Microbiology*. 2013. Vol. 8, no. 7. P. 877–886. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.58>

121. BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm / F. Pantanella et al. *Journal of microbiological methods*. 2008. Vol. 75, no. 3. P. 478–484. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.027>

122. Biotype characterization of *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products of private production in the western regions of Ukraine / M. D. Kukhtyn et al. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2017. Vol. 8, no. 3. P. 384–388. DOI: <https://doi.org/10.15421/021760>

123. Birge E. A. *Bacterial and bacteriophage genetics*. 4th ed. New York : Springer, 2000. 559 p.

124. BoLA-DRB3 gene as a marker of susceptibility and resistance of the Ukrainian black-pied and red-pied dairy breeds to mastitis / T. M. Suprovych et al. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2018. Vol. 9, no. 3. P. 363–368. DOI: <https://doi.org/10.15421/021853>

125. Boles B. R., Horswill A. R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS pathogens*. 2008. Vol. 4, no. 4. P. e1000052. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000052>
126. Bovine fetal mesenchymal stem cells exert antiproliferative effect against mastitis causing pathogen *Staphylococcus aureus* / B. Cahuascanco et al. *Veterinary research*. 2019. Vol. 50, no. 1. P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0643-1>
127. Bovine mastitis – A disease of serious concern for dairy farmers / H. Hamadani et al. *International journal of livestock research*. 2013. Vol. 3, no. 1. P. 42–55. DOI: <https://doi.org/10.5455/ijlr.20130213091143>
128. Bovine Mastitis and its Treatment Strategies / R. Yengkho et al. *Journal of Veterinary Science and Technology*. 2019. Vol. 7, no. 3. P. 11–16. DOI: <https://doi.org/10.37591/rjovst.v7i3.1540>
129. Bovine mastitis prevention: humoral and cellular response of dairy cows inoculated with lactic acid bacteria at the dry-off period / M. Pellegrino et al. *Beneficial microbes*. 2017. Vol. 8, no. 4. P. 589–596. DOI: <https://doi.org/10.3920/bm2016.0194>
130. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia / R. Abebe et al. *BMC veterinary research*. 2016. Vol. 12, no. 1. P. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>
131. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome / C. Fournier et al. *Research in veterinary science*. 2008. Vol. 85, no. 3. P. 439–448. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.01.010>
132. Breeding for organic dairy farming: what types of cows are needed? / R. Rodríguez-Bermúdez et al. *Journal of Dairy Research*. 2019. Vol. 86, no. 1. P. 3–12. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029919000141>
133. Broad-range lytic bacteriophages that kill *Staphylococcus aureus* local field strains / V. Abatangelo et al. *Plos one*. 2017. Vol. 12, no. 7. P. e0181671. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181671>

134. Buttimer C., Coffey A. Bacterial viruses: exploitation for biocontrol and therapeutics. Caister Academic Press, 2020. 704 p.
135. Caplan A. I. New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers. *Journal of orthopaedic research*. 2017. Vol. 35, no. 6. P. 1151–1159. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.23560>
136. Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing *Staphylococcus aureus* strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine developmen. I. capsular polysaccharide typing, isolation and purification of the strains / H. R. Han et al. *Journal of veterinary science*, 2000, Vol. 1, no. 1. P. 53–60. DOI: <https://doi.org/10.4142/jvs.2000.1.1.53>
137. Centers for disease control and prevention guideline for the prevention of surgical site infection, 2017 / S. I. Berrios-Torres et al. *JAMA surgery*. 2017. Vol. 152, no. 8. P. 784. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2017.0904>
138. Chan B. K., Abedon S. T. Phage therapy pharmacology. *Advances in applied microbiology*. 2012. P. 1–23. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394805-2.00001-4>
139. Chan B. K., Abedon S. T., Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future microbiology*. 2013. Vol. 8, no. 6. P. 769–783. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47>
140. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cells under the influence of disinfectants Barez®, Biochlor® and Geocide® / V. L. Kovalenko et al. *Ukrainian journal of ecology*. 2018. Vol. 8, no. 1. P. 547–550. DOI: https://doi.org/10.15421/2018_248
141. Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine / O. M. Berhilevych et al. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2017. Vol. 8, no. 4. P. 559–563. DOI: <https://doi.org/10.15421/021786>
142. Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus* variant *bovis* / Y. Horiuk et al. *Veterinárni medicína*. 2020. Vol. 65, no. 10. P. 421–426. DOI: <https://doi.org/10.17221/55/2020-vetmed>

143. Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains / M. Kwiatek et al. *Archives of virology*. 2011. Vol. 157, no. 2. P. 225–234. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1160-3>

144. Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against *Staphylococcus aureus* strains / M. Kwiatek et al. *Archives of virology*. 2011. Vol. 157, no. 2. P. 225–234. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1160-3>

145. Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis / H. Atalla et al. *Foodborne pathogens and disease*. 2008. Vol. 5, no. 6. P. 785–799. Doi: <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0110>

146. Characterization of lytic activity of Phage SAvB14 on *Staphylococcus aureus* variant bovis / Y. Horiuk et al. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2020. Vol. 7, no. 3. P. 509. DOI: <https://doi.org/10.5455/javar.2020.g447>

147. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France / A. K erouanton et al. *International journal of food microbiology*. 2007. Vol. 115, no. 3. P. 369–375. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.050>

148. Characterization of the antibody isotype response in serum and milk of heifers vaccinated with a *Staphylococcus aureus* bacterin (LysiginTM) / C. D. Luby et al. *Journal of dairy research*. 2007. Vol. 74, no. 2. P. 239–246. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0022029907002476>

149. Chemical composition and antimicrobial activity of two extract of propolis against isolates of *Staphylococcus* spp. and multiresistant bacterial / J. F. Amarante et al. *Pesquisa veterinária brasileira*. 2019. Vol. 39, no. 9. P. 734–743. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6128>

150. Chemical composition and antimicrobial activity of two extract of propolis against isolates of *Staphylococcus* spp. and multiresistant bacterial /

J. F. Amarante et al. *Pesquisa veterinária brasileira*. 2019. Vol. 39, no. 9. P. 734–743. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6128>

151. Cheng W. N., Han S. G. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. *Asian–Australasian Journal of Animal Sciences*. 2020. Vol. 33, no. 11. P. 1699–1713. DOI: [10.5713/ajas.20.0156](https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156)

152. Chestnut honey and bacteriophage application to control pseudomonas aeruginosa and escherichia coli biofilms: evaluation in an ex vivo wound model / A. Oliveira et al. *Frontiers in microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01725>

153. Cheung G. Y., Bae J. S., Otto M. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. *Virulence*. 2021. Vol. 12, no. 1. P. 547–569. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>

154. Chhibber S., Kaur T., Sandeep Kaur. Co–Therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant staphylococcus aureus (MRSA) from diabetic foot infections. *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, no. 2. P. e56022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056022>

155. Chhibber S., Nag D., Bansal S. Inhibiting biofilm formation by Klebsiella pneumoniae B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage. *BMC microbiology*. 2013. Vol. 13, no. 1. P. 174. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-174>

156. Chitosan and cloxacillin combination improve antibiotic efficacy against different lifestyle of coagulase–negative Staphylococcus isolates from chronic bovine mastitis / M. L. Breser et al. *Scientific reports*. 2018. Vol. 8, no. 1. P. 1–13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23521-0>

157. Citral, a monoterpenoid aldehyde interacts synergistically with norfloxacin against methicillin resistant Staphylococcus aureus / P. Gupta et al. *Phytomedicine*. 2017. Vol. 34. P. 85–96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.016>

158. Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenicity, biofilm production, and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus isolated from bovine raw milk in

North West India / V. Sharma et al. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2017. Vol. 16, no. 1. P. 65–72.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0242-9>

159. Coagulase Negative Staphylococci as an emerging cause of bovine mastitis: prevalence, antimicrobial resistance and biofilm formation / F. R El-Seedy et al. *Journal of Veterinary Medical Research*. 2017. Vol. 24, no. 1. P. 1–11. DOI: [10.21608/JVMR.2017.43256](https://doi.org/10.21608/JVMR.2017.43256)

160. Coevolutionary dynamics shape the structure of bacteria-phage infection networks / M. A. Fortuna et al. *Evolution*. 2019. Vol. 73, no. 5. P. 1001–1011. DOI: <https://doi.org/10.1111/evo.13731>

161. Cold adaptation regulated by cryptic prophage excision in *Shewanella oneidensis* / Z. Zeng et al. *The ISME Journal*. 2016. Vol. 10, no. 12. P. 2787–2800. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.85>

162. Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce staphylococcus aureus biofilm formation / D. R. Alves et al. *Applied and environmental microbiology*. 2014. Vol. 80, no. 21. P. 6694–6703. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.01789-14>

163. Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control. Effective from 2008–09–18. Official edition. Official Journal of the European Union, 2008. 84 p.

164. Commission Regulation (EU) No 2018/848 of 30 May 2018 on organic production and labelling of organic products and repealing Council Regulation (EC) No 834/2007. Effective from 2018–06–14. Official edition. *Official Journal of the European Union*, 2018. 92 p.

165. Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions / Z. Erez et al. *Nature*. 2017. Vol. 541, no. 7638. P. 488–493. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature21049>

166. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico / A. El-Sayed et al. *Veterinaria Mexico*. 2006. Vol. 37, no. 2. P. 165–179.

167. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms / M. Roesch et al. *Journal of Dairy Science*. 2006. Vol. 89, no. 3. P. 989–997. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72164-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72164-6)

168. Comparison of cow-side diagnostic tests for subclinical mastitis of dairy cows in Musanze district, Rwanda / B. Iraguha et al. *Journal of the South African veterinary association*. 2017. Vol. 88. P. 1–6. DOI: <https://doi.org/10.4102/jsava.v88i0.1464>

169. Comparison of methods for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from food products / M. Corrente et al. *Letters in applied microbiology*. 2007. Vol. 45, no. 5. P. 535–539. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02226.x>

170. Comparison of the minimum bactericidal concentration of antibiotics on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*: mastitis causative agents / Y. V. Horiuk et al. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. Vol. 9, no. 6. P. 616–622.

171. Concerted dispersion of *Staphylococcus aureus* biofilm by bacteriophage and ‘green synthesized’ silver nanoparticles / S. Manoharadas et al. *RSC advances*. 2021. Vol. 11, no. 3. P. 1420–1429. DOI: <https://doi.org/10.1039/d0ra09725j>

172. Conlon B. P., Rowe S. E., Lewis K. Persister Cells in Biofilm Associated Infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham, 2014. P. 1–9. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-09782-4_1

173. Correlations of blood serum and milk biochemical profiles with subclinical mastitis in Cholistani cattle / A. Qayyum et al. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 2018. Vol. 55, no. 4. P. 959–964. DOI: <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/18.6682>

174. Corticosteroids in idiopathic granulomatous mastitis: a systematic review and meta-analysis / G. Godazandeh et al. *Surgery Today*. 2021. Vol. 51. P. 1897–1905. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00595-021-02234-4>
175. Côté-Gravel J., Malouin F. Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. *Journal of dairy science*. 2019. Vol. 102, no. 5. P. 4727–4740. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15272>
176. Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91. Effective from 2007-07-20. Official edition. *Official Journal of the European Union*, 2007. 23 p.
177. CRISPy-web: An online resource to design sgRNAs for CRISPR applications / K. Blin et al. *Synthetic and systems biotechnology*. 2016. Vol. 1, no. 2. P. 118–121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.01.003>
178. Dairy farmers' perspectives on antibiotic use: a qualitative study / K. Fischer et al. *Journal of dairy science*. 2019. Vol. 102, no. 3. P. 2724–2737. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15015>
179. Danis-Włodarczyk K., Dąbrowska K., Abedon S. T. Phage therapy: the pharmacology of antibacterial viruses. *Current issues in molecular biology*. 2021. P. 81–164. DOI: <https://doi.org/10.21775/cimb.040.081>
180. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2010. Vol. 74, no. 3. P. 417–433. DOI: <https://doi.org/10.1128/mubr.00016-10>
181. Defensin γ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization / V. Díaz-Murillo et al. *Peptides*. 2016. Vol. 78. P. 109–118. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.02.008>
182. Design and preclinical development of a phage product for the treatment of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* infections / S. Lehman et al. *Viruses*. 2019. Vol. 11, no. 1. P. 88. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11010088>

183. Detection of Biofilm and some Enterotoxins of *Staphylococcus aureus* Isolates in Ice Cream / W. Younis et al. *Journal of Advanced Veterinary Research*. 2021. Vol. 11, no. 4. P. 230–236.
184. Detection of plasmid-borne extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis / C. Freitag та ін. *Veterinary microbiology*. 2017. Vol. 200. C. 151–156. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.010>
185. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells / E. A. Pereyra et al. *Veterinary Microbiology*. 2016. Vol. 183. P. 69–77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.002>
186. Detilleux J. Tolerance to bovine clinical mastitis: Total, direct, and indirect milk losses. *Journal of dairy science*. 2018. Vol. 101, no. 4. P. 3334–3343. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13976>
187. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection / R. T. Schooley et al. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017. Vol. 61, no. 10. P. 1–13. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00954-17>
188. Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis: in vitro studies on antimicrobial and cytotoxic activities / G. T. P. Machado et al. *Canadian Journal of Animal Science*. 2019. Vol. 99, no. 4. P. 713–723.
189. Dickey J., Perrot V. Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *Plos one*. 2019. Vol. 14, no. 1. P. e0209390. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209390>
190. Differential somatic cell count in milk before, during, and after lipopolysaccharide- and lipoteichoic-acid-induced mastitis in dairy cows / S. K. Wall et al. *Journal of Dairy Science*. 2018. Vol. 101. P. 5362–5373. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14152>

191. Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection / J. Günther et al. *Scientific reports*. 2017. Vol. 7, no. 1. P. 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05107-4>
192. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. Effective from 2001–11–28. Official edition. *Official Journal of the European Communities*, 2001. 62 p.
193. Distance to pig farms as risk factor for community-onset livestock-associated MRSA CC398 infection in persons without known contact to pig farms—A nationwide study / J. C. H. Anker et al. *Zoonoses and public health*. 2018. Vol. 65, no. 3. P. 352–360. DOI: <https://doi.org/10.1111/zph.12441>
194. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France / M. A. Botrel et al. *Foodborne pathogens and disease*. 2010. Vol. 7, no. 5. P. 479–487. Doi: <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0425>
195. Distribution of classical enterotoxin genes in staphylococci from milk of cows with and without mastitis and the cowshed environment / M. Piechota et al. *Polish journal of veterinary sciences*. 2014. Vol. 17, no. 3. P. 407–411. DOI: <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0058>
196. Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine / Y. V. Horiuk et al. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2018. Vol. 20, №. 83. P. 115–119. DOI: <https://doi.org/10.15421/nvlvet8322>
197. Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China / S.-C. Wang et al. *Veterinary microbiology*. 2009. Vol. 137, no. 3–4. P. 276–281. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.007>
198. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides / E. Mylonakis et al. *Philosophical transactions of the royal society B*:

biological sciences, 2016. Vol. 371, no. 1695. P. 20150290.
DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0290>

199. Does treatment order matter? Investigating the ability of bacteriophage to augment antibiotic activity against staphylococcus aureus biofilms / D. Kumaran et al. *Frontiers in microbiology*. 2018. Vol. 9.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00127>

200. Donlan R. M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in microbiology*. 2009. Vol. 17, no. 2. P. 66–72.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.002>

201. Düzgüneş N., Sessevmez M., Yildirim M. Bacteriophage therapy of bacterial infections: the rediscovered frontier. *Pharmaceuticals*. 2021. Vol. 14, no. 1. P. 34. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph14010034>

202. Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection / L. Vidakovic et al. *Nature microbiology*. 2017. Vol. 3, no. 1. P. 26–31. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0050-1>

203. Effect of bacteriophage infection in combination with tobramycin on the emergence of resistance in escherichia coli and pseudomonas aeruginosa biofilms / L. Coulter et al. *Viruses*. 2014. Vol. 6, no. 10. P. 3778–3786.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v6103778>

204. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows / Y. T. Gröhn et al. *Journal of dairy science*. 2004. Vol. 87, no. 10. P. 3358–3374. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(04\)73472-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(04)73472-4)

205. Effect of Phage SAvB14 combined with antibiotics on Staphylococcus aureus variant bovis / Y. V. Horiuk et al. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2021. Vol. 12, no. 3. P. 531–536. DOI: <https://doi.org/10.15421/022173>

206. Effect of subclinical and clinical mastitis on haematobiochemical profile and milk leukocyte count in indigenous cows / K. Sarvesha et al. *Journal of Cell and Tissue Research*. 2016. Vol. 16, no. 3. P. 5829–5834.

207. Effect of Temperature on the lytic activity of Bacteriophage Phage SAvB14, specific for Staphylococcus aureus variant bovis / Y. V. Horiuk et

al. *Veterinary science, technologies of animal husbandry and nature management*. 2019. No. 4. P. 37–40. DOI: <https://doi.org/10.31890/vttp.2019.04.07>

208. Effective elimination of Staphylococcal contamination from hospital surfaces by a bacteriophage–probiotic sanitation strategy: a monocentric study / M. D'Accolti et al. *Microbial biotechnology*. 2019. Vol. 12, no. 4. P. 742–751. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13415>

209. Effects of chronic Staphylococcus aureus infection on immunological parameters and functionality of macrophages isolated from bovine mammary secretions / M. S. Renna et al. *Microbial pathogenesis*. 2019. Vol. 137, P. 103743. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103743>

210. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows / G. Bertoni et al. *Journal of dairy science*. 2008. Vol. 91, no. 9. P. 3300–3310. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2008-0995>

211. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical staphylococcus aureus mastitis in lactating dairy cattle / J. J. Gill et al. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006. Vol. 50, no. 9. P. 2912–2918. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01630-05>

212. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by Pseudomonas aeruginosa (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial / P. Jault et al. *The lancet infectious diseases*. 2019. Vol. 19, no. 1. P. 35–45. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30482-1)

213. Efficacy of bacteriophages against staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis / I. Titze et al. *Pharmaceuticals*. 2020. Vol. 13, no. 3. P. 35. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph13030035>

214. Efficacy of Staphylococcus aureus vaccines for bovine mastitis: a systematic review / U. P. Pereira et al. *Veterinary microbiology*. 2011. Vol. 148, no. 2–4. P. 117–124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.003>

215. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds / Y. H. Schukken et al. *Journal of dairy science*. 2014. Vol. 97, no. 8. P. 5250–5264. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8008>
216. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds / Y. H. Schukken et al. *Journal of dairy science*. 2014. Vol. 97, no. 8. P. 5250–5264. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8008>
217. Eick S. Biofilms. *Oral biofilms*. 2020. P. 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1159/000510184>
218. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus* / R. M. Dedrick et al. *Nature medicine*. 2019. Vol. 25, no. 5. P. 730–733. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
219. Enhancement of antibacterial activity of tilmicosin against *Staphylococcus aureus* by solid lipid nanoparticles in vitro and in vivo / X. F. Wang et al. *The veterinary journal*. 2012. Vol. 191, no. 1. P. 115–120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.11.019>
220. Enteric-coated bacteriophage tablets for oral administration against gastrointestinal infections / D. Khanal et al. *International journal of pharmaceutics*. 2021. Vol. 609. P. 121206. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121206>
221. Eradication of vancomycin-resistant enterococci by combining phage and vancomycin / M. Shlezinger et al. *Viruses*. 2019. Vol. 11, no. 10. P. 954. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11100954>
222. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow / W. Petzl et al. *Veterinary research*. 2008. Vol. 39, no. 2. P. 1–23. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres:2007057>
223. EU Clinical Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations, and

administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use. *Manual for research ethics committees*. 2003. P. 184–195. DOI: <https://doi.org/10.1017/cbo9780511550089.032>

224. Evaluating the effectiveness of two bovine mastitis vaccines and their influences on oxidant and antioxidant capacities of milk / N. Tashakkori et al. *Tropical animal health and production*. 2019. Vol. 52, no. 3. P. 1493–1501. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02156-x>

225. Evaluation of bacteriophage anti-biofilm activity for potential control of orthopedic implant-related infections caused by staphylococcus aureus / J. Morris et al. *Surgical infections*. 2019. Vol. 20, no. 1. P. 16–24. DOI: <https://doi.org/10.1089/sur.2018.135>

226. Evaluation of bacteriophage anti-biofilm activity for potential control of orthopedic implant-related infections caused by staphylococcus aureus / J. Morris et al. *Surgical infections*. 2019. Vol. 20, no. 1. P. 16–24. DOI: <https://doi.org/10.1089/sur.2018.135>

227. Evaluation of dermal and respiratory chloroform exposure in humans / B. Levesque et al. *Environmental health perspectives*. 1994. Vol. 102, no. 12. P. 1082. DOI: <https://doi.org/10.2307/3431996>

228. Evaluation of increased milking frequency as an additional treatment for cows with clinical mastitis / V. Krömker et al. *Journal of dairy research*. 2009. Vol. 77, no. 1. P. 90–94. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0022029909990422>

229. Evaluation of phage therapy in the treatment of Staphylococcus aureus-induced mastitis in mice / H. Geng et al. *Folia microbiologica*. 2019. Vol. 65, no. 2. P. 339–351. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00729-9>

230. Evaluation of staphylococcal bacteriophage sb-1 as an adjunctive agent to antibiotics against rifampin-resistant staphylococcus aureus biofilms / L. Wang et al. *Frontiers in microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 1–9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.602057>

231. Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection / M. Schmelcher et al. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015. Vol. 70, no. 5. P. 1453–1465. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dku552>

232. Experimental phage therapy against staphylococcus aureus in mice / R. Capparelli et al. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007. Vol. 51, no. 8. P. 2765–2773. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01513-06>

233. Exploitation of the cooperative behaviors of anti-crispr phages / A. Chevallereau et al. *Cell host & microbe*. 2020. Vol. 27, no. 2. P. 189–198. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.12.004>

234. Expression of a β -Defensin mRNA, Lingual Antimicrobial Peptide, in Bovine Mammary Epithelial Tissue Is Induced by Mastitis / K. Swanson et al. *Infection and immunity*. 2004. Vol. 72, no. 12. P. 7311–7314. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.72.12.7311-7314.2004>

235. Expression of cytokines in dairy cattle mammary gland parenchyma during chronic staphylococcal infection / E. Kawecka-Grochocka et al. *Veterinary Research*. 2021. Vol. 52, no. 1. P. 1–12. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13567-021-01003-y>

236. Extended-spectrum beta-lactamase production and multi-drug resistance among Enterobacteriaceae isolated in Addis Ababa, Ethiopia / D. S. Teklu et al. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019. Vol. 8, no. 1. P. 1–12. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0488-4>

237. Fauconnier A. Regulating phage therapy: The biological master file concept could help to overcome regulatory challenge of personalized medicines. *EMBO Rep*. 2017. Vol. 18, no. 2. P. 198–200. Doi: <https://doi.org/10.15252/embr.201643250>

238. Fauconnier A. Phage therapy regulation: from night to dawn. *Viruses*. 2019. Vol. 11, no. 4. P. 352. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11040352>

239. FDA 2020 report on antimicrobial sales for food-producing animals. *U.S. Food and Drug Administration*. URL: <https://www.fda.gov/animal->

[veterinary/cvm-updates/fda-releases-annual-summary-report-antimicrobials-sold-or-distributed-2020-use-food-producing](#)

240. Fernández L., Rodríguez A., García P. Phage or foe: an insight into the impact of viral predation on microbial communities. *The ISME Journal*. 2018. Vol. 12, no. 5. P. 1171–1179. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0049-5>

241. Ferriol-González C., Domingo-Calap P. Phages for biofilm removal. *Antibiotics*. 2020. Vol. 9, no. 5. P. 268. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050268>

242. Fetsch A., Johler S. Staphylococcus aureus as a foodborne pathogen. *Current clinical microbiology reports*. 2018. Vol. 5, no. 2. P. 88–96. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0094-x>

243. Filamentous bacteriophage promote biofilm assembly and function / P. R. Secor et al. *Cell host & microbe*. 2015. Vol. 18, no. 5. P. 549–559. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.013>

244. Fischetti V. A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current opinion in microbiology*. 2008. Vol. 11, no. 5. P. 393–400. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.012>

245. Fish and fish waste-based fertilizers in organic farming—with status in Norway: A review / I. Ahuja et al. *Waste Management*. 2020. Vol. 115. P. 95–112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.025>

246. Flow Cytometry–Detected Immunological Markers and on Farm Recorded Parameters in Composite Cow Milk as Related to Udder Health Status / G. De Matteis et al. *Veterinary Sciences*. 2020. Vol. 7, no. 3. P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci7030114>

247. Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms / R. Briandet et al. *Applied and environmental microbiology*. 2008. Vol. 74, no. 7. P. 2135–2143. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02304-07>

248. Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them / M. Kukhtyn et al. *Eastern-European journal of enterprise*

technologies. 2017. Vol. 5, 11 (89). P. 26–33. DOI: <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2017.110488>

249. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy / D. J. Malik et al. *Advances in colloid and interface science*. 2017. Vol. 249. P. 100–133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>

250. Fraunholz M., Sinha B. Intracellular Staphylococcus aureus: live-in and let die. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012. Vol. 2. P. 43. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00043>

251. Furfaro L. L., Payne M. S., Chang B. J. Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018. Vol. 8. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00376>

252. Garzoni C., Kelley W. L. Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence. *Trends in microbiology*. 2009. Vol. 17, no. 2. P. 59–65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.005>

253. Genetic variability and biodiversity of Ukrainian Gray cattle by the BoLA–DRB3 gene / T. M. Suprovych et al. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2021. Vol. 12, no. 1. P. 33–41. DOI: <https://doi.org/10.15421/022106>

254. Genomic characterization of two Staphylococcus epidermidis bacteriophages with anti-biofilm potential / D. Gutiérrez et al. *BMC genomics*. 2012. Vol. 13, no. 1. P. 228. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-228>

255. Genotoxicity and toxicological studies / J. K. Patra et al. *A practical guide to pharmacological biotechnology*. Singapore, 2019. P. 55–75. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-6355-9_4

256. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis / M. Bardiau et al. *Letters in Applied Microbiology*. 2016. Vol. 57, no. 3. P. 181–186. Doi: <https://doi.org/10.1111/lam.12099>

257. Genotyping of long term persistent Staphylococcus aureus in bovine subclinical mastitis / B. F. Rossi et al. *Microbial pathogenesis*. 2019. Vol. 132. P. 45–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.031>

258. Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics / K. Artursson et al. *Veterinary microbiology*. 2016. Vol. 193. P. 156–161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.012>
259. Gentisaldehyde and its derivative 2, 3–dihydroxybenzaldehyde show antimicrobial activities against bovine mastitis *Staphylococcus aureus* / A. Schabauer et al. *Frontiers in veterinary science*. 2018. Vol. 5. P. 148. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00148>
260. Gentisaldehyde and its derivative 2,3–dihydroxybenzaldehyde show antimicrobial activities against bovine mastitis *staphylococcus aureus* / A. Schabauer et al. *Frontiers in veterinary science*. 2018. Vol. 5. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00148>
261. Geographic distribution of *staphylococcus aureus* causing invasive infections in europe: a molecular–epidemiological analysis / H. Grundmann et al. *PLoS medicine*. 2010. Vol. 7, no. 1. P. e1000215. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000215>
262. Geredew Kifelew L., Mitchell J. G., Speck P. Mini–review: efficacy of lytic bacteriophages on multispecies biofilms. *Biofouling*. 2019. Vol. 35, no. 4. P. 472–481. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1613525>
263. Gertsch J., Viveros–Paredes J. M., Taylor P. Plant immunostimulants–Scientific paradigm or myth?. *Journal of ethnopharmacology*. 2011. Vol. 136, no. 3. P. 385–391. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.044>
264. Gigante A., Atterbury R. J. Veterinary use of bacteriophage therapy in intensively–reared livestock. *Virology journal*. 2019. Vol. 16, no. 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1260-3>
265. Gomes F., Henriques M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current microbiology*. 2016. Vol. 72, no. 4. P. 377–382. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>
266. Gomes F., Henriques M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current microbiology*. 2015. Vol. 72, no. 4. P. 377–382. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>

267. Gomes F., Saavedra M. J., Henriques M. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and disease*. 2016. Vol. 74, no. 3. P. ftw006. DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw006>
268. Gufriy D., Gaydyuk M. Investigation of cumulation effects of Erbisol. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2015. Vol. 17, no. 1. P. 36–39.
269. Griffiths M. Improving the safety and quality of milk: improving quality in milk products. Oxford : Woodhead Pub., 2010. 506 p.
270. Gupta, R. E. N. U., Kumar, S. A. N. D. E. E. P., & Khurana, R. A. J. E. S. H. Essential oils and mastitis in dairy animals: A review. *Haryana Vet*. 2020. Vol. 59. P. 1–9.
271. Hata E. Bovine mastitis outbreak in Japan caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* New York/Japan clone. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2016. Vol. 28, no. 3. P. 291–298. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638716643126>
272. Heterogeneity of host TLR2 stimulation by *Staphylococcus aureus* isolates / D. Hilmi et al. *PloS one*. 2014. Vol. 9, no. 5. P. e96416. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096416>
273. Hogeveen H., Huijps K., Lam T. J. G. M. Economic aspects of mastitis: new developments. *New Zealand veterinary journal*. 2011. Vol. 59, no. 1. P. 16–23. DOI: <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165>
274. Hogeveen H., Steeneveld W., Wolf C. A. Production diseases reduce the efficiency of dairy production: A review of the results, methods, and approaches regarding the economics of mastitis. *Annual Review of Resource Economics*. 2019. Vol. 11. P. 289–312. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-100518-093954>
275. Horiuk Y. V. Characterization of the biological properties of bacteriophages *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Scientific messenger of LNU of*

- veterinary medicine and biotechnologies*, 2019, Vol. 21, no. 96. P. 47–52. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9608>
276. Horiuk Y. V. Fagotherapy of cows mastitis as an alternative to antibiotics in the system of obtaining environmentally safe milk. *Scientific messenger of LNU of veterinary medicine and biotechnologies*, 2018, Vol. 20, no. 88. P. 42–47. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet8807>
277. Horiuk Y. V. Isolation of bacteriophages specific for staphylococcus aureus var. bovis. *Theoretical and applied veterinary medicine*, 2019, Vol. 7, no. 3. P. 143–146. DOI: <https://doi.org/10.32819/2019.71025>
278. Horiuk Y. V. Lytic activity of staphylococcal bacteriophage on different biotypes of staphylococcus aureus. *Scientific messenger of LNU of veterinary medicine and biotechnologies*, 2019, Vol. 21, no. 94. P. 115–120. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9421>
279. Horiuk Y. Therapeutic efficacy of bacteriophage drug Fagomast in clinical mastitis of cows. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 2022, Vol. 24, no. 105. P. 89–93. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10513>
280. Horiuk Y. V. The effect of various titers of bacteriophages on the amount of Staphylococcus aureus variant bovis. *Veterinary science, technologies of animal husbandry and nature management*, 2020, No. 5. P. 26–31. DOI: <https://doi.org/10.31890/vttp.2020.05.05>
281. Hormetic promotion of biofilm growth by polyvalent bacteriophages at low concentrations / B. Zhang et al. *Environmental science & technology*, 2020, Vol. 54, no. 19. P. 12358–12365. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c03558>
282. Hosseinidoust Z., Tufenkji N., van de Ven T. G. M. Formation of biofilms under phage predation: considerations concerning a biofilm increase. *Biofouling*, 2013, Vol. 29, no. 4. P. 457–468. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.779370>
283. Housby J. N., Mann N. H. Phage therapy. *Drug discovery today*, 2009, Vol. 14, no. 11–12. P. 536–540. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.03.006>

284. Høyland–Krogsho N. M., Mærkedahl R. B., Svenningsen S. L. A quorum–sensing–induced bacteriophage defense mechanism. *MBio*. 2013. Vol. 4, no. 1. P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00362–12>
285. Hussain R., Gaiani C., Scher J. From high milk protein powders to the rehydrated dispersions in variable ionic environments: a review. *Journal of food engineering*. 2012. Vol. 113, no. 3. P. 486–503. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.011>
286. Hygienic status of raw milk after phytoceuticals using / L. A. Kondrasii et al. *Scientific messenger of LNU of veterinary medicine and biotechnologies*. 2019. Vol. 21, no. 95. P. 84–88. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9515>
287. Hyman P., Abedon S. T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in applied microbiology*. 2010. P. 217–248. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0065–2164\(10\)70007–1](https://doi.org/10.1016/s0065–2164(10)70007–1)
288. Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins / F. Maurin et al. *Revue de medecine veterinaire*. 2004. Vol. 155, no. 2. P. 92–96.
289. Idowu T., Zhanel G. G., Schweizer F. A dimer, but not monomer, of tobramycin potentiates ceftolozane against multidrug–resistant and extensively drug–resistant *Pseudomonas aeruginosa* and delays resistance development. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2020. Vol. 64, no. 3. P. e02055–19. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02055–19>
290. Igbal M. R. Bovine Mastitis in Fiji: Economic Implications and Management—A Review. *Journal of Agricultural Science*. 2021. Vol. 13, no. 10. P. 162–174. DOI: [10.5539/jas.v13n10p162](https://doi.org/10.5539/jas.v13n10p162)
291. Immune response of *Staphylococcus aureus* strains in a mouse mastitis model is linked to adaptive capacity and genotypic profiles / E. A. Pereyra et al. *Veterinary microbiology*. 2017. Vol. 204. P. 64–76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.009>

292. Impact of acute clinical mastitis on cow behavior / J. Siivonen et al. *Applied Animal Behaviour Science*. 2011. Vol. 132, no. 3–4. P. 101–106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.04.005>
293. Impact of extracellular nuclease production on the biofilm phenotype of *Staphylococcus aureus* under in vitro and in vivo conditions / K. E. Beenken et al. *Infection and immunity*. 2012. Vol. 80, no. 5. P. 1634–1638. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.06134-11>
294. Improving animal health on organic dairy farms: stakeholders' view on policy options / M. Krieger et al. *Sustainability*. 2020. Vol. 12, no. 7. P. 3001. DOI: <https://doi.org/10.3390/su12073001>
295. Improving the safety of staphylococcus aureus polyvalent phages by their production on a staphylococcus xylosus strain / L. El Haddad et al. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 7. P. e102600. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102600>
296. In vitro and in vivo antimicrobial activity of two essential oils *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* against bovine *Staphylococcus* and *Streptococcus mastitis* pathogen / M. Abboud et al. *Middle East Journal of Agriculture Research*. 2015. Vol. 4. P. 975–983.
297. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital–admitted patients and their association with antimicrobial resistance / P. Neopane et al. *International journal of general medicine*. 2018. Volume 11. P. 25–32. DOI: <https://doi.org/10.2147/ijgm.s153268>
298. In vitro lytic efficiency of *Staphylococcus aureus* bacteriophages in bacteria from bovine mastitis: a meta–analysis / B. M. Barasuol et al. *Ciência Rural*. 2021. Vol. 51. P. 1–11.
299. Influence of staphylococcal Phage SAvB14 on biofilms, formed by *Staphylococcus aureus* variant bovis / Y. V. Horiuk et al. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2019. Vol. 10, no. 3. P. 314–318. DOI: <https://doi.org/10.15421/021948>
300. Inhibition of staphylococcus aureus invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live lactobacillus casei / D. S. Bouchard et al. *Applied*

and environmental microbiology. 2012. Vol. 79, no. 3. P. 877–885. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.03323-12>

301. Inside job: staphylococcus aureus host–pathogen interactions / J. Horn et al. *International journal of medical microbiology*. 2018. Vol. 308, no. 6. P. 607–624. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.009>

302. Insights into mechanisms used by Staphylococcus aureus to avoid destruction by human neutrophils / J. M. Voyich et al. *The Journal of Immunology*. 2005. Vol. 175, no. 6. P. 3907–3919. Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3907>

303. Insights into the antibiotic resistance in Biofilms–A Review / J. P. Sahoo et al. *Environment Conservation Journal*. 2021. Vol. 22, no. 3. P. 59–67. Doi: <https://doi.org/10.36953/ECJ.2021.22307>

304. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments / A. Chevallereau et al. *Nature reviews microbiology*. 2021. Vol. 20, no. 1. P. 49–62. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00602-y>

305. Internalization, distribution, and activity of peptide H2 against the intracellular multidrug–resistant bovine mastitis–causing bacterium Staphylococcus aureus / X. Wang et al. *Scientific reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. P. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44459-x>

306. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo–controlled, double–blind clinical trial / L. Leitner et al. *The lancet infectious diseases*. 2020. Vol. 21, no. 3. P. 427–436. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30330-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30330-3)

307. Introducing yesterday’s phage therapy in today’s medicine / J.–P. Pirnay et al. *Future virology*. 2012. Vol. 7, no. 4. P. 379–390. DOI: <https://doi.org/10.2217/fvl.12.24>

308. Invited review: a critical appraisal of mastitis vaccines for dairy cows / P. Rainard et al. *Journal of dairy science*. 2021. Vol. 104, no. 10. P. 10427–10448. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20434>

309. Invited review: a systematic review and qualitative analysis of treatments other than conventional antimicrobials for clinical mastitis in dairy cows / D. Francoz et al. *Journal of dairy science*. 2017. Vol. 100, no. 10. P. 7751–7770. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12512>

310. Invited review: incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows / H. Jamali et al. *Journal of dairy science*. 2018. Vol. 101, no. 6. P. 4729–4746. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13730>

311. Invited review: microbiota of the bovine udder: contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility / H. Derakhshani et al. *Journal of dairy science*. 2018. Vol. 101, no. 12. P. 10605–10625. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14860>

312. Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus* / M. H. Lin et al. *PloS one*. 2012. Vol. 7, no. 3. P. e34388. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034388>

313. Iodine in Swiss milk depending on production (conventional versus organic) and on processing (raw versus UHT) and the contribution of milk to the human iodine supply / B. Walther et al. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2018. Vol. 46. P. 138–143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.12.004>

314. Ismail Z. B. Mastitis vaccines in dairy cows: recent developments and recommendations of application. *Veterinary world*. 2017. Vol. 10, no. 9. P. 1057–1062. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1057-1062>

315. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, Φ JL-1, from a cucumber fermentation / Z. Lu et al. *International journal of food microbiology*. 2003. Vol. 84, no. 2. P. 225–235. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00111-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00111-9)

316. Isolation and characterization of bacteriophages active against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* / A. Moodley et al. *Research in veterinary science*. 2019. Vol. 122. P. 81–85. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.11.008>

317. Isolation and characterization of phages with lytic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to clonal complex 398 / B. Kraushaar et al. *Archives of virology*. 2013. Vol. 158, no. 11. P. 2341–2350. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1707-6>

318. Isolation and characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections / S. O'Flaherty et al. *Letters in applied microbiology*. 2005. Vol. 41, no. 6. P. 482–486. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2005.01781.x>

319. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages against *Staphylococcus aureus* from India: newer therapeutic agents against Bovine mastitis / M. Y. Ganaie et al. *Veterinary research communications*. 2018. Vol. 42, no. 4. P. 289–295. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-018-9736-y>

320. Isolation and host range of bacteriophage with lytic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and potential use as a fomite decontaminant / K. C. Jensen et al. *Plos one*. 2015. Vol. 10, no. 7. P. e0131714. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131714>

321. Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities / A. J. Synnott et al. *Applied and environmental microbiology*. 2009. Vol. 75, no. 13. P. 4483–4490. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02641-08>

322. Jassim H. Y., Abdul-Wadood I. Efficacy of reliable milk and blood biomarkers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis. *Advances in animal and veterinary sciences*. 2019. Vol. 7, no. 10. DOI: <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.10.898.903>

323. Josse J., Laurent F., Diot A. Staphylococcal adhesion and host cell invasion: fibronectin-binding and other mechanisms. *Frontiers in microbiology*. 2017. Vol. 8. P. 2433. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02433>

324. Kahl B. C. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*—a bacterial survival strategy. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014. Vol. 21. P. 515–522. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.05.016>

325. Kakasis A., Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International journal of antimicrobial agents*. 2019. Vol. 53, no. 1. P. 16–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004>
326. Kamal F., Dennis J. J. Burkholderia cepacia complex phage–antibiotic synergy (PAS): antibiotics stimulate lytic phage activity. *Applied and environmental microbiology*. 2014. Vol. 81, no. 3. P. 1132–1138. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02850-14>
327. Keefe G. Update on control of staphylococcus aureus and streptococcus agalactiae for management of mastitis. *Veterinary clinics of north america: food animal practice*. 2012. Vol. 28, no. 2. P. 203–216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010>
328. Khazaie F., Ahmadi E. Bovine subclinical mastitis–associated methicillin–resistant Staphylococcus aureus, selective genotyping and antimicrobial susceptibility profile of the isolates in Kurdistan province of Iran. *Iranian journal of microbiology*. 2021. Vol. 13, no. 1. P. 65–73. DOI: [10.18502/ijm.v13i1.5494](https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5494)
329. Kirby A. E. Synergistic action of gentamicin and bacteriophage in a continuous culture population of staphylococcus aureus. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, no. 11. P. e51017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051017>
330. Klaas I. C., Zadoks R. N. An update on environmental mastitis: challenging perceptions. *Transboundary and emerging diseases*. 2017. Vol. 65. P. 166–185. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12704>
331. Kuipers A., Koops W. J., Wemmenhove H. Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *Journal of dairy science*. 2016. Vol. 99, no. 2. P. 1632–1648. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8428>
332. Kumar R., Yadav B. R., Singh R. S. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in Staphylococcus aureus isolated from mastitic Sahiwal cattle. *Journal of biosciences*. 2011. Vol. 36, no. 1. P. 175–188. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9004-6>

333. Kwiecinski J. M., Horswill A. R. Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Current opinion in microbiology*. 2020. Vol. 53. P. 51–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.005>
334. Labrie S. J., Samson J. E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature reviews microbiology*. 2010. Vol. 8, no. 5. P. 317–327. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
335. Lago A., Godden S. M. Use of rapid culture systems to guide clinical mastitis treatment decisions. *Veterinary clinics of north america: food animal practice*. 2018. Vol. 34, no. 3. P. 389–412. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.06.001>
336. Large variations in clinical antibiotic activity against Staphylococcus aureus biofilms of periprosthetic joint infection isolates / J. B. Mandell et al. *Journal of Orthopaedic Research®*. 2019. Vol. 37, no. 7. P. 1604–1609. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.24291>
337. Lasa I., Penadés J. R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in microbiology*. 2006. Vol. 157, no. 2. P. 99–107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.003>
338. Le traitement des mammites cliniques de la vache laitière par des huiles essentielles / M. Kammerer et al. *Innovations Agronomiques*. 2009. Vol. 4. P. 79–83.
339. Leslie K. E., Petersson–Wolfe C. S. Assessment and management of pain in dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 2012. Vol. 28, no. 2. P. 289–305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.04.002>
340. Lessons learned from the first 10 consecutive cases of intravenous bacteriophage therapy to treat multidrug–resistant bacterial infections at a single center in the united states / S. Aslam et al. *Open forum infectious diseases*. 2020. Vol. 7, no. 9. P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa389>

341. Leung C. Y., Weitz J. S. Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system. *Journal of theoretical biology*. 2017. Vol. 429. P. 241–252. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.037>
342. Levchenko A., Fotin O., Ylko, E. Production inspection of efficiency of vaccine “Mastivac” against clinical and subclinical mastitis in cows. *Scientific and Technical Bulletin of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives and Institute of Animal Biology*. 2019. Vol. 20, no. 2. P. 88–94. Doi: <https://doi.org/10.36359/scivp.2019-20-2.12>
343. Lewis K., Ausubel F. M. Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature biotechnology*. 2006. Vol. 24, no. 12. P. 1504–1507. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt1206-1504>
344. Li X. Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2009. Vol. 69, no. 12. P. 1555–1623. DOI: <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>
345. Li L., Zhang Z. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Molecular biology reports*. 2014. Vol. 41, no. 9. P. 5829–5838. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3457-2>
346. Li L., Zhang Z. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Molecular biology reports*. 2014. Vol. 41, no. 9. P. 5829–5838. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3457-2>
347. Life cycle assessment of conventional and organic milk production in the Netherlands / M. A. Thomassen et al. *Agricultural systems*. 2008. Vol. 96, no. 1–3. P. 95–107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2007.06.001>
348. Lin D. M., Koskella B., Lin H. C. Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 2017. Vol. 8, no. 3. P. 162. DOI: <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>

349. Lobočka M. B., Glowacka A., Golec P. Methods for bacteriophage preservation. *Methods in molecular biology*. New York, NY, 2017. P. 219–230. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_17
350. Looking for alternative treatments for bovine and caprine mastitis: Evaluation of the potential of *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL), both alone and in combination with antibiotics / T. F. Procópio et al. *MicrobiologyOpen*. 2019. Vol. 8, no. 11. P. e869. Doi: <https://doi.org/10.1002/mbo3.869>
351. Low Levels of β -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* / J. B. Kaplan et al. *MBio*. 2012. Vol. 3, no. 4. P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00198-12>
352. Lowy F. D. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen?. *Trends in microbiology*. 2000. Vol. 8, no. 8. P. 341–343. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01803-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01803-5)
353. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages / C. Howard-Varona et al. *The ISME Journal*. 2017. Vol. 11, no. 7. P. 1511–1520. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>
354. Lytic and genomic properties of spontaneous host-range Kayvirus mutants prove their suitability for upgrading phage therapeutics against staphylococci / T. Botka et al. *Scientific reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. P. 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41868-w>
355. Lytic bacteriophages against bacterial biofilms formed by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus* isolated from burn wounds / R. R. Pallavali et al. *Phage*. 2021. Vol. 2, no. 3. P. 120–130. DOI: <https://doi.org/10.1089/phage.2021.0004>
356. Machowska A., Stålsby Lundborg C. Drivers of irrational use of antibiotics in Europe. *International journal of environmental research and public health*. 2018. Vol. 16, no. 1. P. 27. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph16010027>

357. Magdesian K. G. Antimicrobial susceptibility testing. *Interpretation of equine laboratory diagnostics*. Hoboken, NJ, USA, 2017. P. 297–300. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118922798.ch49>
358. Magin V., Garrec N., Andrés Y. Selection of bacteriophages to control in vitro 24 h old biofilm of pseudomonas aeruginosa isolated from drinking and thermal water. *Viruses*. 2019. Vol. 11, no. 8. P. 749. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11080749>
359. Malanovic N., Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta (BBA) – biomembranes*. 2016. Vol. 1858, no. 5. P. 936–946. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.004>
360. Malik B., Bhattacharyya S. Antibiotic drug-resistance as a complex system driven by socio-economic growth and antibiotic misuse. *Scientific reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46078-y>
361. Malik D. J. Bacteriophage encapsulation using spray drying for phage therapy. *Current issues in molecular biology*. 2021. P. 303–316. DOI: <https://doi.org/10.21775/cimb.040.303>
362. Mammary gland pathology subsequent to acute infection with strong versus weak biofilm forming staphylococcus aureus bovine mastitis isolates: a pilot study using non-invasive mouse mastitis model / J. Gogoi-Tiwari et al. *Plos one*. 2017. Vol. 12, no. 1. P. e0170668. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170668>
363. Mastitis control in dairy herds / ed. by R. Blowey, P. Edmondson. Wallingford : CABI, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1079/9781845935504.0000>
364. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review / C. Le Maréchal et al. *Dairy Science & Technology*. 2011. Vol. 91, no. 3. P. 247–282. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0009-6>
365. Mastitis in ewes: Somatic cell counts, pathogens and antibiotic resistance / K. Tvarožková et al. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food*

Sciences. 2021. Vol. 9, no. 3. P. 661–670. DOI: [10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.661–670](https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.661-670)

366. Mayer J. D., Caruso D. R., Salovey P. Emotional intelligence meets traditional standards for an intelligence. *Intelligence*. 1999. Vol. 27, no. 4. P. 267–298. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0160-2896\(99\)00016-1](https://doi.org/10.1016/s0160-2896(99)00016-1)

367. Mazurenko V. R., Dreval D. V., Sobko I. O. Biodiversity of species and antimicrobial resistance of bovine milk with clinical and subclinical mastitis. *Bacterial empire. Scicell*. 2020. Vol. 3, no. 4. P. 77–80.

368. Mbindyo C. M., Gitao G. C., Mulei C. M. Prevalence, etiology, and risk factors of mastitis in dairy cattle in embu and kajiado counties, Kenya. *Veterinary medicine international*. 2020. Vol. 2020. P. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8831172>

369. Medrano–Galarza, C., Gibbons, J., Wagner, S., De Passillé, A. M., & Rushen, J. (2012). Behavioral changes in dairy cows with mastitis / C. Medrano–Galarza et al. *Journal of dairy science*. 2012. Vol. 95, no. 12. P. 6994–7002. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5247>

370. Melchior M. B., Fink–Gremmels J., Gaastra W. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. *Veterinary Microbiology*. 2007. Vol. 125, no. 1–2. P. 141–149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.019>

371. Metagenome analysis of Russian and Georgian Pyophage cocktails and a placebo–controlled safety trial of single phage versus phage cocktail in healthy *Staphylococcus aureus* carriers / S. McCallin et al. *Environmental microbiology*. 2018. Vol. 20, no. 9. P. 3278–3293. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14310>

372. Methicillin-Resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of *scmec iva* between *staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* / F. Barbier et al. *The journal of infectious diseases*. 2010. Vol. 202, no. 2. P. 270–281. DOI: <https://doi.org/10.1086/653483>

373. Methicillin-resistant food-related *Staphylococcus aureus*: a review of current knowledge and biofilm formation for future studies and applications / A. I. Doulgeraki et al. *Research in microbiology*. 2017. Vol. 168, no. 1. P. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.08.001>
374. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy / G. Normanno et al. *International journal of food microbiology*. 2007. Vol. 117, no. 2. P. 219–222. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.006>
375. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / A. S. Lee et al. *Nature reviews Disease primers*. 2018. Vol. 4, no. 1. P. 1–23. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
376. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research / N. A. Turner et al. *Nature reviews microbiology*. 2019. Vol. 17, no. 4. P. 203–218. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
377. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel / B. Hanselman et al. *Emerging infectious diseases*. 2006. Vol. 12, no. 12. P. 1933–1938. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1212.060231>
378. Miles A. M., Huson H. J. Graduate Student Literature Review: understanding the genetic mechanisms underlying mastitis. *Journal of dairy science*. 2021. Vol. 104, no. 1. P. 1183–1191. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18297>
379. Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows / P. Cremonesi et al. *Plos one*. 2018. Vol. 13, no. 10. P. e0205054. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205054>
380. Milk somatic cell count, lactate dehydrogenase activity, and immunoglobulin G concentration associated with mastitis caused by different pathogens: A field study / L. E. Hernandez Castellano et al. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 2017. Vol. 159, no. 5. P. 283–290. DOI: [10.17236/sat00115](https://doi.org/10.17236/sat00115)

381. MILK Symposium review: Improving control of mastitis in dairy animals in Nepal / K. Sah et al. *Journal of Dairy Science*. 2020. Vol. 103, no. 11. P. 9740–9747. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18314>
382. Mirzaei B., Babaei R., Valinejad S. Staphylococcal Vaccine Antigens related to biofilm formation. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2020. P. 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1767449>
383. Moelling K., Broecker F., Willy C. A wake-up call: we need phage therapy now. *Viruses*. 2018. Vol. 10, no. 12. P. 688. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10120688>
384. Molecular basis of bacterial host interactions by gram-positive targeting bacteriophages / M. Dunne et al. *Viruses*. 2018. Vol. 10, no. 8. P. 397. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10080397>
385. Molecular basis of bacterial host interactions by gram-positive targeting bacteriophages / M. Dunne et al. *Viruses*. 2018. Vol. 10, no. 8. P. 397. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10080397>
386. Molecular basis of lysis-lysogeny decisions in gram-positive phages / A. Brady et al. *Annual review of microbiology*. 2021. Vol. 75, no. 1. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-033121-020757>
387. Molecular characterization of Staphylococcus aureus strains in bovine mastitis milk in Bangladesh / M. N. Hoque et al. *International journal of veterinary science and medicine*. 2018. Vol. 6, no. 1. P. 53–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.03.008>
388. Molecular characterization of virulence factors in Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis in central Ethiopia / D. T. Tegegne et al. *Annals of Microbiology*. 2021. Vol. 71, no. 1. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13213-021-01639-3>
389. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring / K. Y. Le et al. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014. Vol. 4. P. 167. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00167>

390. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results / A. de Jong et al. *Veterinary microbiology*. 2018. Vol. 213. P. 73–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.021>
391. Mutti M., Corsini L. Robust approaches for the production of active ingredient and drug product for human phage therapy. *Frontiers in microbiology*. 2019. Vol. 10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02289>
392. Nanocurcumin ameliorates Staphylococcus aureus–induced mastitis in mouse by suppressing NF- κ B signaling and inflammation / S. Suresh et al. *International immunopharmacology*. 2018. Vol. 65. P. 408–412. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.034>
393. Nano–Strategies to fight multidrug resistant bacteria–“a battle of the titans” / P. V. Baptista et al. *Frontiers in microbiology*. 2018. Vol. 9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01441>
394. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents / S. Mushtaq et al. *EXCLI journal*. 2018. Vol. 17. P. 420–451. DOI: <https://doi.org/10.17179/excli2018-1174>
395. Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows / M. Åkerstedt et al. *Journal of dairy research*. 2010. Vol. 78, no. 1. P. 88–96. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0022029910000786>
396. Nelson D., Loomis L., Fischetti V. A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2001. Vol. 98, no. 7. P. 4107–4112. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.061038398>
397. New approach to monitor transboundary particulate pollution over Northeast Asia / M. E. Park et al. *Atmospheric chemistry and physics*. 2014. Vol. 14, no. 2. P. 659–674. DOI: <https://doi.org/10.5194/acp-14-659-2014>
398. New perspective of *origanum vulgare* L. and *satureja montana* L. essential oils as bovine mastitis treatment alternatives / Z. Kovačević et

- al. *Antibiotics*, 2021, Vol. 10, no. 12, P. 1460.
 Doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121460>
399. New York State dairy farmers' perceptions of antibiotic use and resistance: A qualitative interview study / M. Wemette et al. *Plos one*, 2020, Vol. 15, no. 5, P. 1–23. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232937>
400. Nilsson A. S. Phage therapy—constraints and possibilities. *Uppsala journal of medical sciences*, 2014, Vol. 119, no. 2, P. 192–198.
401. Nilsson A. S. Pharmacological limitations of phage therapy. *Uppsala journal of medical sciences*, 2019, Vol. 124, no. 4, P. 218–227.
 DOI: <https://doi.org/10.1080/03009734.2019.1688433>
402. Nilsson A. S. Pharmacological limitations of phage therapy. *Uppsala journal of medical sciences*, 2019, Vol. 124, no. 4, P. 218–227.
 DOI: <https://doi.org/10.1080/03009734.2019.1688433>
403. Noble W. C., Naidoo J. Evolution of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: the role of the skin. *British journal of dermatology*, 2006, Vol. 98, no. 4, P. 481–489, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1978.tb06547.x>
404. Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis – live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins / A. Angelopoulou et al. *Critical reviews in microbiology*, 2019, Vol. 45, no. 5–6, P. 564–580.
 DOI: <https://doi.org/10.1080/1040841x.2019.1648381>
405. Novel approaches for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Using nanoparticles to overcome multidrug resistance / K. Vanamala et al. *Drug Discovery Today*, 2021, Vol. 26, no. 1, P. 31–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.011>
406. Novel approaches for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: using nanoparticles to overcome multidrug resistance / K. Vanamala et al. *Drug discovery today*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.011>

407. Novel group of leaderless multipeptide bacteriocins from gram-positive bacteria / K. V. Ovchinnikov et al. *Applied and environmental microbiology*. 2016. Vol. 82, no. 17. P. 5216–5224. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.01094-16>
408. Occurrence and aetiology of Staphylococcal mastitis—a review / A. Kalińska et al. *Animal Science Papers & Reports*. 2018. Vol. 36, no. 3. P. 263–273.
409. Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland / V. Gindonis et al. *Acta Vet Scand*. 2013. Vol. 55. P. 61. DOI: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-61>
410. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds / C. Locatelli et al. *Journal of dairy science*. 2017. Vol. 100, no. 1. P. 608–619. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11797>
411. ohde C., Wittmann J., Kutter E. Bacteriophages: a therapy concept against multi-drug-resistant bacteria. *Surgical infections*. 2018. Vol. 19, no. 8. P. 737–744. DOI: <https://doi.org/10.1089/sur.2018.184>
412. Oliveira A., Maria de Lourdes R. S. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC research notes*. 2010. Vol. 3, no. 1. P. 1–8. Doi: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-260>
413. Oliver S. P., Murinda S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Veterinary clinics of north america: food animal practice*. 2012. Vol. 28, no. 2. P. 165–185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.005>
414. Olson M. R., Axler R. P., Hicks R. E. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *Journal of virological methods*. 2004. Vol. 122, no. 2. P. 147–152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.010>
415. Optimizing the european regulatory framework for sustainable bacteriophage therapy in human medicine / G. Verbeken et al. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2012. Vol. 60, no. 3. P. 161–172. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0175-0>

416. Organic foods contribution to nutritional quality and value / M. E. Popa et al. *Trends in Food Science & Technology*. 2019. Vol. 84. P. 15–18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.003>
417. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy / L. M. Kasman et al. *Journal of virology*. 2002. Vol. 76, no. 11. P. 5557–5564. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5557-5564.2002>
418. Paracetamol modulates biofilm formation in *Staphylococcus aureus* clonal complex 8 strains / A. R. Sultan et al. *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11, no. 1. P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84505-1>
419. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis / A. M. Heikkilä et al. *Journal of dairy science*. 2018. Vol. 101, no. 10. P. 9493–9504. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14824>
420. Paving a regulatory pathway for phage therapy / I. Huys et al. *EMBO reports*. 2013. Vol. 14, no. 11. P. 951–954. DOI: <https://doi.org/10.1038/embor.2013.163>
421. Payet J. P., Suttle C. A. To kill or not to kill: the balance between lytic and lysogenic viral infection is driven by trophic status. *Limnology and oceanography*. 2013. Vol. 58, no. 2. P. 465–474. DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.2.0465>
422. Phage as agents of lateral gene transfer / C. Canchaya et al. *Current opinion in microbiology*. 2003. Vol. 6, no. 4. P. 417–424. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00086-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00086-9)
423. Phage Lytic Protein LysRODI Prevents Staphylococcal Mastitis in Mice / D. Gutiérrez et al. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 1–7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00007>
424. Phage mobility is a core determinant of phage–bacteria coexistence in biofilms / M. Simmons et al. *The ISME Journal*. 2017. Vol. 12, no. 2. P. 531–543. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.190>

425. Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections / D. Pires et al. *Current opinion in microbiology*. 2017. Vol. 39. P. 48–56.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.004>

426. Phage therapy for limb-threatening prosthetic knee klebsiella pneumoniae infection: case report and in vitro characterization of anti-biofilm activity / E. J. Cano et al. *Clinical infectious diseases*. 2020. Vol. 73, no. 1. P. 144–151 DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa705>

427. Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages / A. A. Cisek et al. *Current microbiology*. 2016. Vol. 74, no. 2. P. 277–283. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1166-x>

428. Phage therapy: assessment of the efficacy of a bacteriophage isolated in the treatment of salmonellosis induced by *Salmonella enteritidis* in mice / F. Nikkhahi et al. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*. 2017. Vol. 10, no. 2. P. 131–136.

429. Phage therapy: past, present and future / ed. by S. T. Abedon et al. *Frontiers Media SA*, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/978-2-88945-251-4>

430. Phage treatment of human infections / S. T. Abedon et al. *Bacteriophage*. 2011. Vol. 1, no. 2. P. 66–85.

Doi: <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>

431. Phage–Antibiotic synergy via delayed lysis / M. Kim et al. *Applied and environmental microbiology*. 2018. Vol. 84, no. 22.

DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02085-18>

432. Phages as biocontrol agents in dairy products / M. C. Garcia–Anaya et al. *Trends in food science & technology*. 2020. Vol. 95. P. 10–20.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.10.006>

433. Pharmacological and immunological aspects of phage therapy / P. Manohar et al. *Infectious microbes and diseases*. 2019. Vol. 1, no. 2. P. 34–42.

DOI: <https://doi.org/10.1097/im9.000000000000013>

434. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation / P. Vasudevan et al. *Veterinary microbiology*. 2003. Vol. 92, no. 1–2. P. 179–185. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00360-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00360-7)

435. Piccinini R., Borromeo V., Zecconi A. Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Veterinary microbiology*. 2010. Vol. 145, no. 1–2. P. 100–105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.005>

436. Pirnay J.-P., De Vos D., Verbeken G. Clinical application of bacteriophages in Europe. *Microbiology Australia*. 2019. Vol. 40, no. 1. P. 8. DOI: <https://doi.org/10.1071/ma19010>

437. Pissuwan D., Niidome T., Cortie M. B. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *Journal of controlled release*. 2011. Vol. 149, no. 1. P. 65–71. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.12.006>

438. Pol M., Ruegg P. L. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Journal of dairy science*. 2007. Vol. 90, no. 1. P. 249–261. Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72626-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72626-7)

439. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections / H. Rohde et al. *Biomaterials*. 2007. Vol. 28, no. 9. P. 1711–1720. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.046>

440. Potential of bacteriophages as disinfectants to control of *Staphylococcus aureus* biofilms / J. Song et al. *BMC microbiology*. 2021. Vol. 21, no. 1. P. 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02117-1>

441. Potential of the polyvalent anti-staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals / S. O'Flaherty et al. *Applied and environmental microbiology*. 2005. Vol. 71, no. 4. P. 1836–1842. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.71.4.1836-1842.2005>

442. Poupard J. Antimicrobial susceptibility testing. Springer, 2013. 204 p. 606#
443. Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1 / J. Fan et al. *Veterinary microbiology*. 2016. Vol. 191. P. 65–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.06.001>
444. Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia / I. Holko et al. *Journal of Dairy Research*. 2019. Vol. 86, no. 4. P. 436–439. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029919000694>
445. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk in Shandong dairy farms / X. Zhao et al. *Food control*. 2020. P. 107836. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107836>
446. Prevalence and distribution of adhesins and the expression of fibronectin-binding protein (FnbA and FnbB) among *Staphylococcus aureus* isolates from Shahrekord Hospitals / E. Soltani et al. *BMC research notes*. 2019. Vol. 12, no. 1. P. 1–5. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4055-0>
447. Prevalence of antibiotic resistant mastitis pathogens in dairy cows in Egypt and potential biological control agents produced from plant endophytic actinobacteria / F. Ameen et al. *Saudi journal of biological sciences*. 2019. Vol. 26, no. 7. P. 1492–1498. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.09.008>
448. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents / P. García et al. *Journal of dairy science*. 2009. Vol. 92, no. 7. P. 3019–3026. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1744>
449. Prevalence of Mastitis and Antibiotic Resistance of Bacterial Isolates from CMT Positive Milk Samples Obtained from Dairy Cows, Camels, and Goats in Two Pastoral Districts in Southern Ethiopia / A. Balemi et al. *Animals*. 2021. Vol. 11, no. 6. P. 1530. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11061530>

450. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany / B. A. Tenhagen et al. *Journal of Dairy Science*. 2006. Vol. 89, no. 7. P. 2542–2551. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72330-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X)

451. Prevalence of production disease related indicators in organic dairy herds in four European countries / M. Krieger et al. *Livestock Science*. 2017. Vol. 198. P. 104–108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.02.015>

452. Prevention of ESKAPE pathogen biofilm formation by antimicrobial peptides WLBU2 and LL37 / Q. Lin et al. *International journal of antimicrobial agents*. 2018. Vol. 52, no. 5. P. 667–672. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.04.019>

453. Prevention of Staphylococcus aureus biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives / D. Kelly et al. *Letters in applied microbiology*. 2012. Vol. 54, no. 4. P. 286–291. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2012.03205.x>

454. Probiotic cellulose: Antibiotic-free biomaterials with enhanced antibacterial activity / L. Sabio et al. *Acta Biomaterialia*. 2021. Vol. 124. P. 244–253. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.039>

455. Probiotics and mastitis: evidence-based marketing? / L. H. Amir et al. *International breastfeeding journal*. 2016. Vol. 11, no. 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13006-016-0078-5>

456. Progression of different udder inflammation indicators and their episode length after onset of inflammation using automatic milking system sensor data / J. Bonestroo et al. *Journal of Dairy Science*. 2021. Vol. 104, no. 3. P. 3458–3473. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18054>

457. Public perceptions of antibiotic use on dairy farms in the United States / M. Wemette et al. *Journal of dairy science*. 2021. Vol. 104, no. 3. P. 2807–2821. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17673>

458. Quality-Controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials / M. Merabishvili et al. *PLoS*

- ONE. 2009. Vol. 4, no. 3. P. e4944.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004944>
459. Rainard P., Riollet C. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction nutrition development*. 2003. Vol. 43, no. 5. P. 439–457. DOI: <https://doi.org/10.1051/rnd:2003031>
460. Rainard P., Foucras G. A critical appraisal of probiotics for mastitis control. *Frontiers in veterinary science*. 2018. Vol. 5. P. 1–13. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00251>
461. Rebooting synthetic phage-inducible chromosomal islands: one method to forge them all / R. Ibarra-Chávez et al. *BioDesign research*. 2020. Vol. 2020. P. 1–14. DOI: <https://doi.org/10.34133/2020/5783064>
462. Red blood cell membrane-camouflaged tedizolid phosphate-loaded PLGA nanoparticles for bacterial-infection therapy / X. Wu et al. *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, no. 1. P. 99. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010099>
463. Reducing antimicrobial use in food animals / T. P. Van Boeckel et al. *Science*. 2017. Vol. 357, no. 6358. P. 1350–1352. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aao1495>
464. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through pseudomonas aeruginosa biofilms / G. W. Hanlon et al. *Applied and environmental microbiology*. 2001. Vol. 67, no. 6. P. 2746–2753. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2746-2753.2001>
465. Rehman S., Khan T., Raza S. Isolation of bacteriophage against Staphylococcus aureus causing mastitis. *International Journal of Advanced Multidisciplinary Research*. 2016. Vol. 3, no. 4. P. 1393–1395.
466. Research of sharp and chronic toxicness of experimental preparation of «Ferosel T» / V. Todoruk et al. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*. 2017. T. 19, № 73. C. 104–111.
467. Resistance of the main pathogens of mastitis of cows to modern antimicrobial drugs / Y. V. Horiuk et al. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*. 2018. Vol. 6, №. 2. P. 49–53.

468. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine staphylococcus aureus / C. Cucarella et al. *Infection and immunity*. 2004. Vol. 72, no. 4. P. 2177–2185. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.72.4.2177-2185.2004>
469. Romulus and remus, two phage isolates representing a distinct clade within the twortlikevirus genus, display suitable properties for phage therapy applications / K. Vandersteegen et al. *Journal of virology*. 2013. Vol. 87, no. 6. P. 3237–3247. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02763-12>
470. Rooijackers S. H., Van Kessel K. P., Van Strijp J. A. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends in microbiology*. 2005. Vol. 13, no. 12. P. 596–601. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.10.002>
471. Rublenko N. M., Deryabin O. M., Golovko A. M. Induction of temperate phages in Salmonella enterica subsp. enterica using Mitomycin C. *Bulletin "Veterinary biotechnology"*. 2018. Vol. 32, no. 1. P. 232–238. DOI: [https://doi.org/10.31073/vet_biotech32\(1\)-30](https://doi.org/10.31073/vet_biotech32(1)-30)
472. Ruegg P. L. A 100-Year Review: mastitis detection, management, and prevention. *Journal of dairy science*. 2017. Vol. 100, no. 12. P. 10381–10397. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
473. Ruegg P. L. What is success? A narrative review of research evaluating outcomes of antibiotics used for treatment of clinical mastitis. *Frontiers in veterinary science*. 2021. Vol. 8. P. 1–14. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.639641>
474. Rumen microbiome structure and metabolites activity in dairy cows with clinical and subclinical mastitis / Y. Wang et al. *Journal of animal science and biotechnology*. 2021. Vol. 12, no. 1. P. 1–21. Doi: <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00543-1>
475. Sachuk R. N. Efficiency of «ointment for wounds» in the complex therapy of avulsive wounds of cows' udder teats. *Scientific messenger of LNU of veterinary medicine and biotechnologies*. 2016. Vol. 18, no. 3(71). P. 91–94. DOI: <https://doi.org/10.15421/nvlvet7121>
476. Safety and efficacy of a mesenchymal stem cell intramammary therapy in dairy cows with experimentally induced Staphylococcus aureus clinical mastitis /

O. A. Peralta et al. *Scientific reports*. 2020. Vol. 10, no. 1. P. 1–7. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59724-7>

477. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection / A. Petrovic Fabijan et al. *Nature microbiology*. 2020. Vol. 5, no. 3. P. 465–472. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0634-z>

478. Sagar S. S., Kumar R., Kaistha S. D. Efficacy of phage and ciprofloxacin co-therapy on the formation and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Arabian journal for science and engineering*. 2016. Vol. 42, no. 1, P. 95–103. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13369-016-2194-3>

479. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis / M. A. N. Diaz et al. *Revista brasileira de farmacognosia*. 2010. Vol. 20, no. 5. P. 724–728. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2010005000013>

480. Seasonal effect on milk productivity and cases of mastitis in Ukrainian Brown Swiss Cows / R. V. Mylostyvyi et al. *Theoretical and applied veterinary medicine*. 2021. Vol. 9, no. 2. P. 66–73. DOI: <https://doi.org/10.32819/2021.92011>

481. Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary research*. 2003. Vol. 34, no. 5. P. 475–491. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres:2003027>

482. Selection of potential anti-adhesion drugs by in silico approaches targeted to ALS3 from *Candida albicans* / E. S. Kioshima et al. *Biotechnology letters*. 2019. Vol. 41, no. 12. P. 1391–1401. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02747-6>

483. Sellera F. P., Madec J. Y., Lincopan N. Comment on: Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019. Vol. 74, no. 2. P. 535–536. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dky043>

484. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* cultures of different biological origin to commercial bacteriophages and phages of *Staphylococcus aureus* var.

bovis / Y. Horiuk et al. *Veterinary world*, 2021, P. 1588–1593.
DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1588-1593>

485. Sequential effect of phages and cold nitrogen plasma against *Escherichia coli* O157:h7 biofilms on different vegetables / H. Cui et al. *International journal of food microbiology*, 2018, Vol. 268, P. 1–9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.004>

486. Serum biochemical parameters and embryo production during superovulatory treatment in dairy cattle / Y. Chorfi et al. *Research in veterinary science*, 2007, Vol. 83, no. 3, P. 318–321.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.01.010>

487. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims / M. E. Sanders et al. *Current opinion in biotechnology*, 2018, Vol. 49, P. 207–216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.09.007>

488. Shin H.-J., Yang S., Lim Y. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* with different degrees of biofilm formation. *Journal of analytical science and technology*, 2021, Vol. 12, no. 1, P. 1–7.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00294-2>

489. Shoda M. *Biocontrol of plant diseases by bacillus subtilis: basic and practical applications*. Taylor & Francis Group, 2019. 326 p.

490. Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy / S. Jöhler et al. *Journal of dairy science*, 2018, Vol. 101, no. 4, P. 2915–2920.
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13815>

491. Short communication: feed iodine concentrations on farms with contrasting levels of iodine in milk / S. I. Borucki Castro et al. *Journal of dairy science*, 2011, Vol. 94, no. 9, P. 4684–4689. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3714>

492. Short communication: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd /

- F. F. Guimarães et al. *Journal of dairy science*. 2017. Vol. 100, no. 1. P. 726–730. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11700>
493. Sillankorva S., Azeredo J. Bacteriophage attack as an anti-biofilm strategy. *Methods in molecular biology*. New York, NY, 2014. P. 277–285. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0467-9_20
494. Singh A., Gaur M., Misra R. Understanding the connect of quorum sensing and crispr-cas system: potential role in biotechnological applications. *Quorum sensing and its biotechnological applications*. Singapore, 2018. P. 231–247. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0848-2_15
495. Sinha B., Fraunholz M. Staphylococcus aureus host cell invasion and post-invasion events. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010. Vol. 300, no. 2–3. P. 170–175. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.019>
496. Some studies on phenotypic and genotypic characters of small colony variants staphylococcus aureus isolated from dairy cows infected with mastitis in egypt / S. S. E. Mohandes et al. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2021. Vol. 9, no. 5. P. 637–647. Doi: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.5.637.647>
497. Sommer M. O., Church G. M., Dantas G. The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence*. 2010. Vol. 1, no. 4. P. 299–303. DOI: <https://doi.org/10.4161/viru.1.4.12010>
498. Species composition and methicillin resistance of staphylococci taken on dairy farms / Y. V. Horiuk et al. *Scientific messenger of LNU of veterinary medicine and biotechnologies*. 2020. Vol. 22, no. 97. P. 13–19. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9703>
499. Species composition of microbiota of cows udder and raw milk quality at mastitis / A. P. Palii et al. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020. Vol. 10, no. 4. P. 78–85. Doi: [10.15421/2020_171](https://doi.org/10.15421/2020_171)
500. Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in north-central and north-eastern Greece: prevalence, characterization and genetic relatedness /

P. Papadopoulos et al. *Food microbiology*. 2019. Vol. 84. P. 103249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103249>

501. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease / N. K. Archer et al. *Virulence*. Vol. 2, no. 5. P. 445–459. Doi: <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17724>

502. Staphylococcus aureus extracellular vesicles elicit an immunostimulatory response in vivo on the murine mammary gland / N. R. Tartaglia et al. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018. Vol. 8. P. 1–17. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00277>

503. Staphylococcus aureus manipulates innate immunity through own and host-expressed proteases / G. Pietrocola et al. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017. Vol. 7. P. 166. Doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00166>

504. Staphylococcus aureus of raw cow's milk / M. D. Kukhtyn et al. *Scientific messenger of LNU of veterinary medicine and biotechnologies*. 2021. Vol. 23, no. 102. P. 53–59. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10208>

505. Staphylococcus aureus phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection / L. Tuchscherer et al. *EMBO molecular medicine*. 2011. Vol. 3, no. 3. P. 129–141. DOI: <https://doi.org/10.1002/emmm.201000115>

506. Staphylococcus aureus small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence / L. Tuchscherer et al. *The Journal of infectious diseases*. 2010. Vol. 202, no. 7. P. 1031–1040. DOI: <https://doi.org/10.1086/656047>

507. Stewart P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International journal of medical microbiology*. 2002. Vol. 292, no. 2. P. 107–113. DOI: <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00196>

508. Stewart P. S., Costerton J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet*. 2001. Vol. 358, no. 9276. P. 135–138. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)

509. Strategies to minimize antibiotic resistance / C.-R. Lee et al. *International journal of environmental research and public health*. 2013. Vol. 10, no. 9. P. 4274–4305. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph10094274>
510. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm–embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis / A. Prenafeta et al. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2010. Vol. 134, no. 3–4. P. 208–217. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.09.020>
511. Suresh M. K., Biswas R., Biswas L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*. 2019. Vol. 309, no. 1. P. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.11.002>
512. Survey of perceptions and attitudes of an international group of veterinarians regarding antibiotic use and resistance on dairy cattle farms / S. G. Llanos–Soto et al. *Preventive Veterinary Medicine*. 2021. Vol. 188. P. 1–13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105253>
513. Survey on the phage resistance mechanisms displayed by a dairy *Lactobacillus helveticus* strain / M. Zago et al. *Food microbiology*. 2017. Vol. 66. P. 110–116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.014>
514. Susceptibility to Nisin, Bactofencin, Pediocin and Reuterin of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* Causing Bovine Mastitis / S. Bennett et al. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10, no. 11. P. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111418>
515. Svircev A., Roach D., Castle A. Framing the future with bacteriophages in agriculture. *Viruses*. 2018. Vol. 10, no. 5. P. 218. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10050218>
516. Synergistic action of phage and antibiotics: parameters to enhance the killing efficacy against mono and dual–species biofilms / E. Akturk et

- al. *Antibiotics*, 2019, Vol. 8, no. 3, P. 103.
DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030103>
517. Synergistic phage–antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro / E. M. Ryan et al. *FEMS immunology & medical microbiology*, 2012, Vol. 65, no. 2, P. 395–398.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2012.00977.x>
518. Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / W. N. Chaudhry et al. *Plos one*, 2017, Vol. 12, no. 1, P. e0168615, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168615>
519. Synergy of nebulized phage PEV20 and ciprofloxacin combination against *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Lin et al. *International journal of pharmaceutics*, 2018, Vol. 551, no. 1–2, P. 158–165.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.024>
520. Tagliaferri T. L., Jansen M., Horz H.–P. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: phages and antibiotics as combined strategy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2019, Vol. 9, P. 22.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00022>
521. Tait K., Skillman L. C., Sutherland I. W. The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. *Biofouling*, 2002, Vol. 18, no. 4, P. 305–311.
DOI: <https://doi.org/10.1080/0892701021000034418>
522. Talbot B. G., Lacasse P. Progress in the development of mastitis vaccines. *Livestock production science*, 2005, Vol. 98, no. 1–2, P. 101–113.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.018>
523. Targeted drug delivery based on gold nanoparticle derivatives / M. Gholipourmalekabadi et al. *Current pharmaceutical design*, 2017, Vol. 23, no. 20, Doi: <https://doi.org/10.2174/1381612823666170419105413>
524. Targeting biofilms in medical devices using probiotic cells: A systematic review / F. M. Carvalho et al. *AIMS Materials Science*, 2021, Vol. 8, no. 4, P. 501–523, Doi: [10.3934/matersci.2021031](https://doi.org/10.3934/matersci.2021031)

525. Targeting biofilms in medical devices using probiotic cells: a systematic review / F. M. Carvalho et al. *AIMS materials science*. 2021. Vol. 8, no. 4. P. 501–523. DOI: <https://doi.org/10.3934/matensci.2021031>
526. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages / F. L. Nobrega et al. *Nature reviews microbiology*. 2018. Vol. 16, no. 12. P. 760–773. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0070-8>
527. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria / I. Yosef et al. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2015. Vol. 112, no. 23. P. 7267–7272. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1500107112>
528. Temperate bacteriophages as regulators of host behavior / T. Argov et al. *Current opinion in microbiology*. 2017. Vol. 38. P. 81–87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.002>
529. Terrestrial Code Online Access – OIE – World Organisation for Animal Health. *OIE – World Organisation for Animal Health*. DOI: <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/>
530. Thacker E. L. Immunomodulators, immunostimulants, and immunotherapies in small animal veterinary medicine. *Veterinary clinics of north america: small animal practice*. 2010. Vol. 40, no. 3. P. 473–483. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.01.004>
531. The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming / E. Cha et al. *Journal of dairy science*. 2011. Vol. 94, no. 9. P. 4476–4487. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4123>
532. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming / D. Bar et al. *Journal of dairy science*. 2008. Vol. 91, no. 6. P. 2205–2214. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0573>
533. The effect of *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and *Enterobacteriaceae* on the development of whey protein levels and oxidative stress

markers in cows with diagnosed mastitis / K. Puppel et al. *Animals*. 2020. Vol. 10, no. 9. P. 1591. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10091591>

534. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *EUCAST: EUCAST*. URL: <http://www.eucast.org>

535. The evaluation of non-specific immune status of heifers in field conditions during the periparturient period / R. Piccinini et al. *Veterinary research*. 2004. Vol. 35, no. 5. P. 539–550. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres:2004030>

536. The GraRS regulatory system controls *Staphylococcus aureus* susceptibility to antimicrobial host defenses / D. Krauset al. *BMC microbiology*. 2008. Vol. 8, no. 1. P. 1–5. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-85>

537. The hidden cost of disease: I. Impact of the first incidence of mastitis on production and economic indicators of primiparous dairy cows / M. A. Puerto et al. *Journal of dairy science*. 2021. Vol. 104, no. 7. P. 7932–7943. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19584>

538. The *icaA* gene in staphylococci from bovine mastitis / M. V. Rumi et al. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2013. Vol. 7, no. 07. P. 556–560. DOI: <https://doi.org/10.3855/jidc.2670>

539. The in vitro host cell immune response to bovine-adapted *Staphylococcus aureus* varies according to bacterial lineage / M. P. Murphy et al. *Scientific reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. P. 1–13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42424-2>

540. The influence of external factors on bacteriophages—review / E. Jończyk et al. *Folia microbiologica*. 2011. Vol. 56, no. 3. P. 191–200. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>

541. The interaction of phage and biofilms / I. W. Sutherland et al. *FEMS microbiology letters*. 2004. Vol. 232, no. 1. P. 1–6. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(04\)00041-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(04)00041-2)

542. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic / C. Hill

et al. *Nature reviews gastroenterology & hepatology*. 2014. Vol. 11, no. 8. P. 506–514. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

543. The phage therapy paradigm: pre–a–porter or sur–measure? / J. P. Pirnay et al. *Pharmaceutical research*. 2011. Vol. 28, no. 4. P. 934–937. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0313-5>

544. The potential of phage therapy in sepsis / A. Górski et al. *Frontiers in immunology*. 2017. Vol. 8. P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01783>

545. The recombinant phage lysin lysk has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin–resistant staphylococcus aureus / S. O’Flaherty et al. *Journal of bacteriology*. 2005. Vol. 187, no. 20. P. 7161–7164. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.187.20.7161-7164.2005>

546. The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to Staphylococcus aureus / A. Gulmez Saglam et al. *Veterinary world*. 2017. Vol. 10, no. 12. P. 1481–1485. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1481-1485>

547. The selective treatment of clinical mastitis based on on–farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival / A. Lago et al. *Journal of dairy science*. 2011. Vol. 94, no. 9. P. 4457–4467. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4047>

548. The sortase A substrates FnbpA, FnbpB, ClfA and ClfB antagonize colony spreading of Staphylococcus aureus / E. Tsompanidou et al. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, no. 9. P. e44646. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044646>

549. The Use of Probiotics to Fight Biofilms in Medical Devices: A Systematic Review and Meta–Analysis / F. M. Carvalho et al. *Microorganisms*. 2021. Vol. 9, no. 1. P. 1–26. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010027>

550. Theory for the spatiotemporal interaction between lytic phages and biofilm–dwelling bacteria / M. Simmons et al. *bioRxiv*. 2016. P. 1–22. DOI: <https://doi.org/10.1101/086462>

551. Therapeutic application of bacteriophage PHB02 and its putative depolymerase against *Pasteurella multocida* capsular type A in mice / Y. Chen et al. *Frontiers in microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01678>

552. Therapeutic effect of oregano essential oil on subclinical bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / B.-W. Cho et al. *Korean journal of veterinary research*. 2015. Vol. 55, no. 4. P. 253–257. DOI: <https://doi.org/10.14405/kjvr.2015.55.4.253>

553. Therapeutic strategies to counteract antibiotic resistance in MRSA biofilm-associated infections / S. Cascioferro et al. *ChemMedChem*. 2021. Vol. 16, no. 1. P. 65–80. DOI: <https://doi.org/10.1002/cmde.202000677>

554. Titze I., Krömker V. Antimicrobial activity of a phage mixture and a lactic acid bacterium against *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Veterinary sciences*. 2020. Vol. 7, no. 1. P. 31. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci7010031>

555. Tolerance of Biofilms to Antimicrobials and Significance to Antibiotic Resistance in Wounds / A. M. Salisbury et al. *Surgical technology international*. 2018. Vol. 11, no. 33. P. 59–66.

556. Tolerance and resistance of microbial biofilms / O. Ciofu et al. *Nature reviews microbiology*. 2022. P. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00682-4>

557. Topuzoglu B., Bastan A., Salar S. The effect of long term antibiotic treatment on bacteriological cure and somatic cell count at subclinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in lactating dairy cows. *Veterinary Journal of Ankara University*. 2015. Vol. 62. P. 289–294. DOI: https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002694

558. Touchon M., Bernheim A., Rocha E. P. Genetic and life–history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *The ISME Journal*. 2016. Vol. 10, no. 11. P. 2744–2754. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.47>

559. Touchon M., Moura de Sousa J. A., Rocha E. P. Embracing the enemy: the diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer. *Current opinion in microbiology*. 2017. Vol. 38. P. 66–73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.04.010>
560. Toxicological evaluation of the drug "Fagomast" for the treatment of mastitis in cows / Y. V. Horiuk et al. *Veterinary science, technologies of animal husbandry and nature management*. 2021. No. 7. P. 29–34. DOI: <https://doi.org/10.31890/vttp.2021.07.04>
561. Transmission dynamics of Staphylococcus aureus within two Danish dairy cattle herds / C. Kirkeby et al. *Journal of dairy science*. 2019. Vol. 102, no. 2. P. 1428–1442. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15106>
562. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae / J. Rodríguez-Baño et al. *Clinical microbiology reviews*. 2018. Vol. 31, no. 2. P. e00079–17. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-17>
563. Twest R., Kropinski A. M. Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods in molecular biology*. Totowa, NJ, 2009. P. 15–21. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_2
564. Two Phages, phiPLA-RODI and phiPLA-C1C, Lyse Mono- and Dual-Species Staphylococcal Biofilms / D. Gutiérrez et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015. Vol. 81, no. 10. P. 3336–3348. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.03560-14>
565. Udder health of dairy cows fed different dietary energy levels after a short or no dry period without use of dry cow antibiotics / R. J. Van Hoeij et al. *Journal of dairy science*. 2018. Vol. 101, no. 5. P. 4570–4585. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13448>
566. Understanding and exploiting phage-host interactions / E. Stone et al. *Viruses*. 2019. Vol. 11, no. 6. P. 567. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11060567>

567. USDA APHIS / laboratory information and services. USDA APHIS / Home Landing Page.
URL: <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/lab-info-services>
568. Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis / R. S. Dias et al. *Journal of animal science*. 2013. Vol. 91, no. 8. P. 3930–3939. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5884>
569. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis / T. S. Lopes et al. *Research in veterinary science*, 2020. Vol. 131, P. 186–193. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>
570. Vaccinating dairy heifers with a *Staphylococcus aureus* bacterin reduces mastitis at calving / S. C. Nickerson et al. *Large Animal Practice*. 1999. Vol. 20. P. 16–28.
571. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds / H. Landin et al. *Acta veterinaria scandinavica*. 2015. Vol. 57, no. 1. P. 1–6. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0171-6>
572. Vaccine development in *Staphylococcus aureus*: taking the biofilm phenotype into consideration / J. M. Harro et al. *FEMS immunology & medical microbiology*, 2010. Vol. 59, no. 3. P. 306–323. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2010.00708.x>
573. Virulence and enterotoxin gene profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis / M. Roshan et al. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2022. Vol. 80. P. 101724. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101724>
574. Vorobey E. S., Voronkova O. S., Vinnikov A. I. Correction of vaginal dysbiosis in mice caused by a film-forming strain *Staphylococcus aureus*, using bacteriophages and probiotics. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2017. Vol. 8, no. 2. P. 252–258. DOI: <https://doi.org/10.15421/021739>
575. Wallis J., Krömker V., Paduch J.–H. Biofilm challenge: lactic acid bacteria isolated from bovine udders versus staphylococci. *Foods*. 2019. Vol. 8, no. 2. P. 79. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods8020079>

576. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens / C. Bogni et al. *Science against microbial pathogens: Communicafing current research and technological advances*. 2011. P. 483–494.

577. Warren J. C., Hatch M. T. Survival of T3 coliphage in varied extracellular environments. I. viability of the coliphage during storage and in aerosols1. *Applied microbiology*. 1969. Vol. 17, no. 2. P. 256–261. DOI: <https://doi.org/10.1128/am.17.2.256-261.1969>

578. Weinbauer M. G. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews*. 2004. Vol. 28, no. 2. P. 127–181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>

579. Wellnitz O., Bruckmaier R. M. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *The veterinary journal*. 2012. Vol. 192, no. 2. P. 148–152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.013>

580. Wills Q. F., Kerrigan C., Soothill J. S. Experimental bacteriophage protection against staphylococcus aureus abscesses in a rabbit model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005. Vol. 49, no. 3. P. 1220–1221. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.49.3.1220-1221.2005>

581. Wills Q. F., Higgs D. R., Mead A. J. Studying epigenomics in single cells: what is feasible and what can we learn?. *Epigenomics*. 2015. Vol. 7, no. 8. P. 1231–1234. DOI: <https://doi.org/10.2217/epi.15.93>

582. Wills Q. F. The genetics of miRNA and mRNA expression in human lymphoblastoid cell lines: Electronic Thesis or Dissertation. 2012. DOI: <http://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.572601>

583. Wksl3, a new biocontrol agent for salmonella enterica serovars enteritidis and typhimurium in foods: characterization, application, sequence analysis, and oral acute toxicity study / H.-W. Kang et al. *Applied and environmental microbiology*. 2013. Vol. 79, no. 6. P. 1956–1968. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02793-12>

584. Wright G. D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. *Current opinion in microbiology*. 2010. Vol. 13, no. 5. P. 589–594. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.005>
585. Xia G., Wolz C. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, genetics and evolution*. 2014. Vol. 21. P. 593–601. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.022>
586. Xu H.-X., Lee S. F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytotherapy research*. 2001. Vol. 15, no. 1. P. 39–43. Doi: [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200102\)15:1%3C39::aid-ptr684%3E3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200102)15:1%3C39::aid-ptr684%3E3.0.co;2-r)
587. Xue T., Chen X., Shang F. Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. *Journal of dairy science*. 2014. Vol. 97, no. 10. P. 6129–6134. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8344>
588. Yen M., Cairns L. S., Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models. *Nature communications*. 2017. Vol. 8, no. 1. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms14187>
589. Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiological reviews*. 1992. Vol. 56, no. 3. P. 430–481. DOI: <https://doi.org/10.1128/mnbr.56.3.430-481.1992>
590. Zaatout N., Ayachi A., Kecha M. Epidemiological investigation of subclinical bovine mastitis in Algeria and molecular characterization of biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *Tropical animal health and production*. 2020. Vol. 52, no. 1. P. 283–292. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02015-9>
591. Zaatout N., Ayachi A., Kecha M. Interaction of primary mammary bovine epithelial cells with biofilm-forming staphylococci associated with subclinical bovine mastitis. *Iranian journal of veterinary research*. 2019. Vol. 20, no. 1. P. 27–32.

ДОДАТКИ

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України

1. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Perkiy Y.B., Horiuk V.V. Resistance of the main pathogens of mastitis of cows to modern antimicrobial drugs. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*. 2018. Vol. 6 (2). P. 49–53. (Здобувачкою проведено визначення чутливості до антибактеріальних речовин основних збудників маститу у корів та підготовлено матеріали до друку).
2. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Perkiy Y.B., Horiuk V.V. Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2018. Vol. 20 (83). P. 115–119. Doi: <https://doi.org/10.15421/nvlvet8322> (Здобувачкою проведено вивчення поширення основних збудників маститу у корів та підготовлено матеріали до друку).
3. Horiuk Y.V. Fagothrapy of cows mastitis as an alternative to antibiotics in the system of obtaining environmentally safe milk. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2018. Vol. 20 (88). P. 42–47. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet8807>
4. Horiuk Y. Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2019. Vol. 21 (94). P. 115–120. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9421>
5. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Horiuk V.V., Mzyk V.P. Effect of Temperature on the lytic activity of Bacteriophage *Phage SAvB14*, specific for *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Veterinary Science, Technologies of Animal*

Husbandry and Nature Management, 2019, Vol. 4, P. 37–40. Doi: <https://doi.org/10.31890/vttp.2019.04.07> (Здобувачкою проведено визначення впливу температури на літичну активність Phage SAvB14, проаналізовано отримані дані та підготовлено роботу до друку).

6. Horiuk Y.V. Isolation of bacteriophages specific for *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 2019, Vol. 7(3), P. 143–146. Doi: <https://doi.org/10.32819/2019.71025>

7. Horiuk Y. Characterization of the biological properties of bacteriophages *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 2019, Vol. 21(96), P. 47–52. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9608>

8. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M., Salata V., Horiuk V. Species composition and methicillin resistance of staphylococci taken on dairy farms. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 2020, Vol. 22(97), P. 13–19. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9703> (Здобувачкою проведено визначення поширення метицилінрезистентних стафілококів на молочних фермах, проаналізовано отримані результати та підготовлено матеріали до друку).

9. Horiuk Y.V. The effect of various titers of bacteriophages on the amount of *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 2020, Vol. 5, P. 26–31. Doi: <https://doi.org/10.31890/vttp.2020.05.05>

10. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M., Kovalenko V., Mzyk V. (2021). Toxicological evaluation of the drug "Fagomast" for the treatment of mastitis in cows. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 2021, Vol. 7, P. 29–34. Doi: <https://doi.org/10.31890/vttp.2021.07.04> (Здобувачкою проведено токсикологічну оцінку препарату Фагомаст та підготовлено матеріали до друку).

11. Kukhtyn M., **Horiuk Y.**, Salata V., Klymyk V., Vorozhbit N., Rushchinskaya T. *Staphylococcus aureus* of raw cow's milk. *Scientific Messenger*

of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences. 2021. Vol. 23(102). P. 53–59. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10208> (Здобувачка брала участь у лабораторних дослідженнях щодо визначення поширення *S. aureus* у середовищі молочних ферм та підготовці матеріалів до друку).

12. **Горюк Ю.,** Кухтин М., Горюк В., Просяний С. Динаміка морфологічних та біохімічних показників крові корів хворих маститом при застосуванні фагового препарату Фагомаст. *Аграрний вісник Причорномор'я.* 2021. № 100. С. 44–51. Doi: <https://doi.org/10.37000/abbsl.2021.100.09> (Здобувачкою проведено відбір крові корів, хворих маститом, проаналізовано отримані результати та підготовлено роботу до друку).

13. Горюк Ю.В. Терапевтична ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст для лікування субклінічного маститу корів. *Вісник Полтавської державної аграрної академії.* 2021. №3. С. 204–209. Doi: <https://doi.org/10.31210/visnyk2021.03.25>

14. Горюк Ю.В. Визначення ефективності застосування препарату Фагомаст з різними титрами Phage SAvB14. *Науковий вісник ветеринарної медицини.* 2021. №2 С. 57–64. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-168-2-57-64>

15. **Горюк Ю.В.,** Кухтин М.Д., Горюк В.В., Мізик В.П. Вплив препарату Фагомаст на життєдіяльність інфузорій та слизову оболонку очей кроликів. *Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка.* 2022. №35. С. 55–62. Doi: <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2021-2-7> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, їх аналізі та написанні статті).

16. Horiuk Y. Therapeutic efficacy of bacteriophage drug Fagomast in clinical mastitis of cows. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences.* 2022. Vol. 24(105). P. 89–93. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10513>

Статті у періодичних виданнях, включених до категорії «А» Переліку наукових фахових видань України, або у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus

17. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Strayskyu Y.S., Havrylianchyk R.Y., Horiuk V.V., Fotina H.A. Comparison of the minimum bactericidal concentration of antibiotics on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*: mastitis causative agents. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. Vol. 9(6). P. 616–622. (Здобувачкою проведено визначення МБК антибактеріальних речовин щодо планктонних та біоплівкових форм *S. aureus* та підготовлено матеріали до друку).

18. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M., Kovalenko V., Kornienko L., Horiuk V., Liniichuk N. Biofilm formation in bovine mastitis pathogens and the effect on them of antimicrobial drugs. *Independent Journal of Management & Production*. 2019. Vol. 10(7). P. 897–910. Doi: <https://doi.org/10.14807/ijmp.v10i7.1012> (Здобувачкою проведено визначення біоплівкоутворюючих властивостей основних збудників маститу у корів, вплив на них антибіотиків та підготовлено матеріали до друку).

19. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Stravskyu Y.S., Klymnyuk S.I., Vergeles K.M., Horiuk V.V. Influence of staphylococcal *Phage SAvB14* on biofilms, formed by *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10(3). P. 314–318. Doi: <https://doi.org/10.15421/021948> (Здобувачкою проведено визначення впливу бактеріофагу на біоплівки *S. aureus*, виділеного від корів, хворих на мастит, та підготовлено матеріали до друку).

20. **Horiuk Y.**, Horiuk V., Kukhtyn M., Tsvihun A., Kernychnyi S. Characterization of lytic activity of *Phage SAvB14* on *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2020. Vol. 7(3). P. 509–516. Doi: <http://doi.org/10.5455/javar.2020.g447> (Здобувачкою проведено визначення літичних властивостей *Phage SAvB14* щодо *S. aureus*

var. bovis залежно від кількості бактерій та підготовлено матеріали до друку).

21. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M., Horiuk V., Kernychnyi S., Tarasenko L. Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Veterinárni Medicína*. 2020. Vol. 65(10). P. 421–426. Doi: <https://doi.org/10.17221/55/2020-VETMED> (Здобувачкою виділено та описано бактеріофаги, які циркулюють на молочних фермах, та підготовлено матеріали до друку).

22. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M., Kernychnyi S., Laiter-Moskaliuk S., Prosyanyi S., Boltyk N. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* cultures of different biological origin to commercial bacteriophages and phages of *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Veterinary World*. 2021. Vol. 14(6). P. 1588–1593. Doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.1588-1593 (Здобувачкою проведено визначення впливу на стафілококи різного біологічного походження препаратів бактеріофагів промислового виробництва та бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах та підготовлено матеріали до друку).

23. **Horiuk Y.V.**, Kukhtyn M.D., Horiuk V.V., Sytnik V.A., Dashkovskyy O.O. Effect of *Phage SAvB14* combined with antibiotics on *Staphylococcus aureus* variant *bovis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. Vol. 12(3). P. 531–536. Doi: <https://doi.org/10.15421/022173> (Здобувачкою проведено визначення впливу на біоплівкові форми *S. aureus* var. *bovis* бактеріофагу *Phage SAvB14* в комплексі з антибіотиками та підготовлено матеріали до друку).

Патенти України на корисну модель

24. **Горюк Ю. В.**, Кухтин М. Д., Горюк В. В. Бактеріофаг phage SAvS_14 для ветеринарної мікробіології; пат. 139981 Україна: МПК 20.01 C12N 7/00 A61K 35/76 (2015.01) A61P 31/04 (2006.01). № u 2019 03079; заявл. 28.03.2019; опубл. 10.02.2020, Бюл. №3. (Здобувачка брала безпосередню участь у

лабораторних дослідженнях, підготовці та поданні матеріалів до патентування).

25. **Горюк Ю. В.,** Кухтин М. Д., Горюк В. В., Бейко Л. А. Штам *Staphylococcus aureus* var. *bovis* 1491 Г для ветеринарної мікробіології: пат. 137461 Україна: МПК (1901.01) C12N 1/00. № u 2019 03065; заявл. 28.03.2019; опубл. 25.10.2019, Бюл. №20. *(Здобувачка брала безпосередню участь у лабораторних дослідженнях, підготовці та поданні матеріалів до патентування).*

Технічні умови України

26. **Горюк Ю.,** Кухтин М. Технічні умови ТУ У 21.2 22769675 001:2022 Препарат ветеринарний Фагомаст. Кам'янець-Подільський, 2022. 18 с. *(Здобувачка брала участь у розробці рецептури препарату, організації і проведенні експериментальних досліджень, підготовці відповідної документації).*

Методичні рекомендації:

27. **Горюк Ю. В.,** Кухтин М. Д. Виділення бактеріофагів *S. aureus* var. *bovis* на молочних фермах та визначення їх літичної активності. Методичні рекомендації. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2022. 18 с. *(Здобувачка провела експериментальні дослідження, аналіз отриманих результатів та оформила методичні рекомендації).*

28. **Горюк Ю. В.,** Кухтин М. Д. Лікування корів за маститу з використанням бактеріофагового препарату Фагомаст. Методичні рекомендації. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2022. 18 с. *(Здобувачка провела клінічні дослідження, аналіз отриманих результатів та оформила методичні рекомендації).*

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації

29. **Горюк Ю.В.,** Кухтин М.Д. Використання бактеріофагів при органічному виробництві молока. *Органічне виробництво і продовольча*

безпеки. Збірник наукових праць VII Міжнародної науково-практичної конференції, 23-24 травня 2019 р. Житомир, 2019. С. 24–27.

30. **Горюк Ю.В.**, Горюк В.В. Використання бактеріофагів при лікуванні маституу корів. *Аграрна наука та освіта в умовах Євроінтеграції*. Збірник наукових праць міжнародної науково-практичної конференції, 20-21 березня 2019 р. Тернопіль, 2019. С. 309–311.

31. **Горюк Ю.**, Горюк В. Перспективи використання бактеріофагів в якості біоконтролю золотистого стафілококу в молоці. *Стан і перспективи харчової науки та промисловості*. Збірник тез доповідей V міжнародної науково-технічної конференції, 10-11 жовтня 2019 р. Тернопіль, 2019. С. 70–71.

32. Horiuk Y. Influence of pH on lytic activity of Phage SAvB14. *About the problems of science and practice, tasks and ways to solve them*. Abstracts of VI International Scientific and Practical Conference, October 26-30, 2020. Milan, 2020. P. 592–594.

33. **Горюк Ю.В.**, Горюк В.В., Кухтин М.Д. Використання Phage SAvB14 для руйнування біоплівки *Staphylococcus aureus variant bovis*, як альтернатива хіміотерапевтичним засобам. *Наукові дослідження для органічного бізнесу. Тваринництво заради ґрунту» в рамках IV Міжнародного Конгресу Органічна Україна*. Збірник матеріалів Міжнародної науково-практичної конференції, 4 квітня 2020 р. Київ, 2020. С. 62–64.

34. **Horiuk Y.**, Kukhtyn M. Main features of phage SAVB14 specific for *S. aureus var. bovis*. *Organization of scientific research in modern conditions 2020*. Conference proceedings, May 14-15, 2020. Washington, 2020. P. 244–247.

35. **Горюк Ю.**, Кухтин М. Д. Біоконтроль золотистого стафілокока у стічних водах молокопереробних підприємств. *Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти*. Тези доповідей I Міжнародної науково-технічної конференції, 20–21 травня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 81–82.

36. Горюк Ю.В. Взаємодія бактеріофагу Phage SA_vB14 та чутливої до нього культури *S. aureus* var. *bovis*. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин*. Матеріали щоріч. наук.-практ. конф. молодих вчених, 30 червня 2021р. Київ, 2021. С. 6–7.

37. Горюк Ю.В. Характеристика бактеріофагів *Staphylococcus aureus* виділених на молочних фермах. *II конференція «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині» присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підготовки коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові»*. Тези доповідей, 18–19 листопада 2021 р. Львів, 2021. С. 45.

Додаток Б
Свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму

С В І Д О Ц Т В О

про первісне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Подільський державний аграрно-технічний університет
32300, Хмельницька область, м. Кам'янець-Подільський, вул. Шевченка, 13

Цим підтверджується, що штаму мікроорганізму
Staphylococcus aureus var. *bovis* 1491 f
первісно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту
біотехнології і штамів мікроорганізмів

Ресстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: 736

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клонотання, паспорт,
методика, акти

Дата первісного депонування: 08.02.2019 року

Місце зберігання: Подільський державний аграрно-технічний університет
32300, Хмельницька область, м. Кам'янець-Подільський, вул. Шевченка, 13

М.П.

05.03.2019



А.М. Головка

Додаток В
Свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму

С В І Д О Ц Т В О

про первісне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів

Кому видано: Подільський державний аграрно-технічний університет
32300, Хмельницька область, м. Кам'янець-Подільський, вул. Шевченка, 13

Цим підтверджується, що штаму мікроорганізму *Бактеріофаз Phage SAвВ_14*
первісно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту
біотехнології і штамів мікроорганізмів

Регістраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: 737

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: клопотання, паспорт,
методика, акти

Дата первісного депонування: 08.02.2019 року

Місце зберігання: Подільський державний аграрно-технічний університет
32300, Хмельницька область, м. Кам'янець-Подільський, вул. Шевченка, 13

М.П.

05.03.2019



А.М. Головка

Додаток Г
 Патент України на корисну модель



Г. 2 – другий розділ додатка



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **137461** (13) **U**
 (51) МПК (2019.01)
 C12N 1/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
 ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
 СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
 УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 03065	(72) Винахідник(и): Горюк Юлія Вікторівна (UA), Кухтєв Микола Дмитрович (UA), Горюк Віктор Васильович (UA), Бейко Людмила Анатоліївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 28.03.2019	(73) Власник(и): ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО- ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Шевченка, 13, м. Кам'янець- Подільський, Хмельницька обл., 32500 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.10.2019	(74) Представник: Горюк Юлія Вікторівна
(46) Публікація відомостей про видану патенту: 25.10.2019, Бюл. № 20	

(54) ШТАМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VAR. *BOVIS* 1491 f для ветеринарної мікробіології

(57) Реферат:

Штам *Staphylococcus aureus* var. *bovis* 1491 f для ветеринарної мікробіології.

UA 137461 U

Додаток Д
Патент України на корисну модель



Д. 2 – другий розділ додатка



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **139981** (13) **U**
 (51) МПК (2020.01)
C12N 7/00
A61K 35/76 (2015.01)
A61P 31/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
 ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
 СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
 УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2019 03079	(72) Винахідник(и):	Горюк Юлія Вікторівна (UA), Кухтин Микола Дмитрович (UA), Горюк Віктор Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки:	28.03.2019	(73) Власник(и):	ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО- ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Шевченка, 13, м. Кам'янець- Подільський, Хмельницька обл., 32300 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.02.2020	(74) Представник:	Горюк Юлія Вікторівна
(46) Публікація відомостей про видану патенту:	10.02.2020, Бюл.№ 3		

(54) БАКТЕРІОФАГ PHAGE SAvB_14 ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ**(57) Реферат:**

Бактеріофаг Phage SAvB_14, первісно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів під номером 737 (Свідоцтво на штам від 05.03.2019 р.), призначений для використання як перспективного при розробленні препаратів та як тест-об'єкта для ветеринарної мікробіології.

UA 139981 U

Додаток Ж
Технічні умови України

ДКНП 21.20.2

УКНД 11.220

ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Закладу вищої освіти

«Подільський державний університет»

Володимир ІВАНИШИН

«24» _____ 2022 р.

Препарат ветеринарний**«Фагомаст»**

(суспензія для внутрішньочеревної застосування)

Технічні умови**ТУ У 21.2-22769675-001:2022**

(введено вперше)

Дата надання чинності _____

Чинні до _____

РОЗРОБЛЕНО:

Кандидат ветеринарних наук

Юлія ГОРЮК

«04» _____ 05 _____ 2022 р.

Доктор ветеринарних наук, професор

Микола КУХТИН

«24» _____ 05 _____ 2022 р.

Додаток К Методичні рекомендації

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ І ТЕХНОЛОГІЙ У ТВАРИННИЦТВІ

Юлія ГОРЮК, Микола КУХТИН

Виділення бактеріофагів *S. aureus* var. *bovis* на молочних фермах та
визначення їх літичної активності

Методичні рекомендації

м. Кам'янець-Подільський
ЗВО «ЦДУ»
2022 рік

К. 2 – другий розділ додатка

УДК 338.439.021.1

Автори:

Юлія ГОРЮК – кандидат ветеринарних наук, асистент кафедри інфекційних та інвазійних хвороби Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Микола КУХТИН – доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя

*Рекомендовано до друку науково-методичною радою
Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»
(протокол № 4 від 25.04.2022 року)*

Рецензенти:

Віктор КОЗАК – начальник Кам'янець-Подільської районної державної лікарні ветеринарної медицини

Тетяна СУПРОВИЧ – доктор сільськогосподарських наук, професор, професор кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби Національної поліції України Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Виділення бактеріофагів *S. aureus var. bovis* на молочних фермах та визначення їх літичної активності: методичні вказівки / Ю.В. Горюк, М.Д. Кухтин. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2022. – 18 с.

Методичні рекомендації дадуть можливість засвоїти особливості методології виділення та дослідження бактеріофагів, які циркулюють на молочних фермах. Розглянуто основні методи виділення, вивчення властивостей, визначення титру та дослідження впливу фагів на мікробні біоплівки.

© Юлія ГОРЮК, Микола КУХТИН, 2022

Додаток Л **Методичні рекомендації**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ І ТЕХНОЛОГІЙ У ТВАРИННИЦТВІ

Юлія ГОРЮК, Микола КУХТИН

**Лікування корів за маститу з використанням бактеріофагового препарату
«Фагомаст»**

Методичні рекомендації

м. Кам'янець-Подільський
ЗВО «ЦДУ»
2022 рік

Ж. 2 – другий розділ додатка

УДК 338.439.021.1

Автори:

Юлія ГОРЮК – кандидат ветеринарних наук, асистент кафедри інфекційних та інвазійних хвороби Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Микола КУХТИН – доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя

*Рекомендовано до друку науково-методичною радою
Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»
(протокол № 4 від 25.04.2022 року)*

Рецензенти:

Віктор КОЗАК – начальник Кам'янець-Подільської районної державної лікарні ветеринарної медицини

Тетяна СУПРОВИЧ – доктор сільськогосподарських наук, професор, професор кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби Національної поліції України Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Лікування корів за маститу з використанням бактеріофагового препарату «Фагомаст»: методичні рекомендації / Ю.В. Горюк, М.Д. Кухтин. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2022. – 18 с.

Методичні рекомендації дадуть можливість засвоїти особливості лікування корів за маститу з використанням бактеріофагового препарату «Фагомаст», що дозволить ефективно боротися зі збудниками даного захворювання, одержуючи при цьому екологічно безпечне молоко.

© Юлія ГОРЮК, Микола КУХТИН, 2022

Додаток М

Акти впровадження результатів докторської дисертаційної роботи у виробництво

АКТ

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** внутрішньощерстнальний препарат "Фагомаст" на основі бактеріофагів *Phage SA_vB14*, який застосовується для лікування корів за маститу, спричиненого золотистим стафілококом.

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** препарат ветеринарний «Фагомаст» (суспензія для внутрішньощерстного застосування) ТУ У 21.2-22769675-001:2022

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра інфекційних та інвазійних хвороб Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. **Коротка характеристика впровадження:** внутрішньощерстнальний препарат "Фагомаст" для лікування корів за маститу на основі бактеріофагу *Phage SA_vB14*, який високолітичний щодо *S. aureus var. bovis*, основного збудника даного захворювання. 1 мл препарату містить специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^8 фагових часток. «Фагомаст» є малотоксичним, відноситься до IV класу безпеки, не спричиняє подразнюючої дії на шкіру та не проявляє шкірно-резорбтивну дію. Аналогів в Україні не має.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** ТОВ "КОЗАЦЬКА ДОЛИНА 2006", Хмельницька обл., Дунаєвський р-н, село Вихрівка, вул. Центральна, буд. 12-А.

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2022 рік, 50 шт.

7. **Результати впровадження:** Спосіб лікування маститу корів з використанням препарату «Фагомаст» на основі бактеріофагу *Phage SA_vB14* дозволяє ефективно лікувати мастит корів, спричинений *S. aureus var. bovis*. Даний спосіб терапії попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників захворювання, потрапляння залишкових кількостей антибіотиків у молоко та дозволяє одержувати екологічно безпечне молоко.

8. **Відповідальні за впровадження:**

від розробника

Юлія ГОРЮК, асистент кафедри інфекційних та інвазійних хвороб Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

від господарства

Віталій ЗАГОРОДНИЙ, директор ТОВ "КОЗАЦЬКА ДОЛИНА 2006"



(Handwritten signature)

(Handwritten number 313)

(Date: 18.04.2022)

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** внутрішньоцистернальний препарат "Фагомаст" на основі бактеріофагів *Phage SAвB14*, який застосовується для лікування корів за маститу, спричиненого золотистим стафілококом.

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** препарат ветеринарний «Фагомаст» (суспензія для внутрішньоцистернального застосування) ТУ У 21.2-22769675-001:2022

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра інфекційних та інвазійних хвороб Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. **Коротка характеристика впровадження:** внутрішньоцистернальний препарат "Фагомаст" для лікування корів за маститу на основі бактеріофагу *Phage SAвB14*, який високолітичний щодо *S. aureus var. bovis*, основного збудника даного захворювання. 1 мл препарату містить специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^7 фагових часток. «Фагомаст» є малотоксичним, відноситься до IV класу безпечності, не спричинює подразнюючої дії на шкіру та не проявляє шкірно-резорбтивну дію. Аналогів в Україні не має.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** ФГ «Молницьке», Чернівецька обл., Герцаївський р-н, с. Молниця, ВУЛ. Центральна, буд. 57-В

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2021 рік, 100 шт.

7. **Результати впровадження:** Спосіб лікування маститу корів з використанням препарату «Фагомаст» на основі бактеріофагу *Phage SAвB14* дозволяє ефективно лікувати мастит корів, спричинений *S. aureus var. bovis*. Даний спосіб терапії попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників захворювання, потрапляння залишкових кількостей антибіотиків у молоко та дозволяє одержувати екологічно безпечне молоко.

8. **Відповідальні за впровадження:**

від розробника

Юлія ГОРЮК, асистент кафедри інфекційних та інвазійних хвороб Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

від господарства

Михайло КИЛАРУ, лікар ветеринарної медицини ФГ «Молницьке»



« 15 » 10 20 21 р.

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. Назва впровадження: внутрішньоцистернальний препарат "Фагомаст" на основі бактеріофагів *Phage SAvB14*, який застосовується для лікування корів за маститу, спричиненого золотистим стафілококом.

2. Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР: препарат ветеринарний «Фагомаст» (суспензія для внутрішньоцистернального застосування) ТУ У 21.2-22769675-001:2022

3. Підрозділ установи-розробника: кафедра інфекційних та інвазійних хвороб Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. Коротка характеристика впровадження: внутрішньоцистернальний препарат "Фагомаст" для лікування корів за маститу на основі бактеріофагу *Phage SAvB14*, який високолітичний щодо *S. aureus var. bovis*, основного збудника даного захворювання. 1 мл препарату містить специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^7 фагових часток. «Фагомаст» є малотоксичним, відноситься до IV класу безпечності, не спричинює подразнюючої дії на шкіру та не проявляє шкірно-резорбтивну дію. Аналогів в Україні не має.

5. Назва організації, де проведено впровадження: ПП «Аграрна компанія 2004», МТФ с. Ріпва, Хмельницька обл., Волочиський р-н, вул. Центральна 1.

6. Рік та обсяг впровадження: 2021 рік, 100 шт.

7. Результати впровадження: Спосіб лікування маститу корів з використанням препарату «Фагомаст» на основі бактеріофагу *Phage SAvB14* дозволяє ефективно лікувати мастит корів, спричинений *S. aureus var. bovis*. Даний спосіб терапії попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників захворювання, потрапляння залишкових кількостей антибіотиків у молоко та дозволяє одержувати екологічно безпечне молоко.

8. Відповідальні за впровадження:

від розробника

Юлія ГОРЮК, асистент кафедри інфекційних та інвазійних хвороб Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

від господарства

Нестерук О.В., лікар ветеринарної медицини

МТФ с. Ріпва



(Handwritten signatures)

« 10 » 12 2021 р.

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** внутрішньоцистернальний препарат "Фагомаст" на основі бактеріофагів *Phage SAvB14*, який застосовується для лікування корів за маститу, спричиненого золотистим стафілококом.

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** препарат ветеринарний «Фагомаст» (суспензія для внутрішньоцистернального застосування) ТУ У 21.2-22769675-001:2022

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра інфекційних та інвазійних хвороб Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. **Коротка характеристика впровадження:** внутрішньоцистернальний препарат "Фагомаст" для лікування корів за маститу на основі бактеріофагу *Phage SAvB14*, який високолітичний щодо *S. aureus var. bovis*, основного збудника даного захворювання. 1 мл препарату містить специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^7 фагових часток. «Фагомаст» є малотоксичним, відноситься до IV класу безпечності, не спричиняє подразнюючої дії на шкіру та не проявляє шкірно-резорбтивну дію. Аналогів в Україні не має.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** ПП «Аграрна компанія 2004», МТФ с. Соломна, Хмельницька обл., Волочиський р-н, вул. Котовського 1.

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2021 рік, 100 шт.

7. **Результати впровадження:** Спосіб лікування маститу корів з використанням препарату «Фагомаст» на основі бактеріофагу *Phage SAvB14* дозволяє ефективно лікувати мастит корів, спричинений *S. aureus var. bovis*. Даний спосіб терапії попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників захворювання, потрапляння залишкових кількостей антибіотиків у молоко та дозволяє одержувати екологічно безпечне молоко.

8. **Відповідальні за впровадження:**

від розробника

Юлія ГОРІЮК, асистент кафедри інфекційних та інвазійних хвороб Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

від господарства

Чернявко А. І., лікар ветеринарної медицини МТФ с. Соломна



(Handwritten signatures)

« 01 » 12 2021 р.

АКТ

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** внутрішньоцистернальний препарат "Фагомаст" на основі бактеріофагів *Phage SAvB14*, який застосовується для лікування корів за маститу, спричиненого золотистим стафілококом.

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** препарат ветеринарний «Фагомаст» (суспензія для внутрішньоцистернального застосування) ТУ У 21.2-22769675-001:2022

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра інфекційних та інвазійних хвороб Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. **Коротка характеристика впровадження:** внутрішньоцистернальний препарат "Фагомаст" для лікування корів за маститу на основі бактеріофагу *Phage SAvB14*, який високолітичний щодо *S. aureus var. bovis*, основного збудника даного захворювання. 1 мл препарату містить специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^7 фагових часток. «Фагомаст» є малотоксичним, відноситься до IV класу безпечності, не спричинює подразнюючої дії на шкіру та не проявляє шкірно-резорбтивну дію. Аналогів в Україні не має.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** ПП «Аграрна компанія 2004», МТФ с. Поляни, Хмельницька обл., Волочиський р-н, вул. Свободи 1.

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2021 рік, 100 шт.

7. **Результати впровадження:** Спосіб лікування маститу корів з використанням препарату «Фагомаст» на основі бактеріофагу *Phage SAvB14* дозволяє ефективно лікувати мастит корів, спричинений *S. aureus var. bovis*. Даний спосіб терапії попереджує розвиток антибіотикорезистентності у збудників захворювання, потрапляння залишкових кількостей антибіотиків у молоко та дозволяє одержувати екологічно безпечне молоко.

8. **Відповідальні за впровадження:**від розробника

Юлія ГОРЮК, асистент кафедри інфекційних та інвазійних хвороб Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

від господарства

Паньківщина А.М., лікар ветеринарної медицини МТФ с. Поляни



« 26 » 11 2021 р.