

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ**  
**МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ С.З. ГЖИЦЬКОГО**

**ГОРЮК ЮЛІЯ ВІКТОРІВНА**

УДК 619:615.038:615.28:578:579

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

16.00.04 – ветеринарна фармакологія та токсикологія

**РЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора ветеринарних наук

Львів – 2023

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Закладі вищої освіти «Подільський державний університет»  
Міністерства освіти і науки України

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор  
**Гунчак Василь Михайлович,**  
Львівський національний університет ветеринарної  
медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького,  
завідувач кафедри фармакології та токсикології;

доктор ветеринарних наук, старший науковий  
співробітник

**Кушнір Ігор Михайлович,**  
Державний науково-дослідний контрольний  
інститут ветеринарних препаратів та кормових  
добавок, завідувач лабораторії бактеріологічного  
контролю якості і безпечності ветеринарних  
препаратів;

доктор ветеринарних наук, старший дослідник

**Сачук Роман Миколайович,**  
Рівненський державний гуманітарний університет,  
професор кафедри екології, географії та туризму.

Захист дисертації відбудеться « 19 » квітня 2023 року о «10<sup>00</sup>» годині на  
засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.826.03 у Львівському  
національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені  
С. З. Гжицького за адресою: 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 50, конференц-  
зал.

З дисертацією можна ознайомитися на офіційному сайті <https://lvet.edu.ua> та у  
бібліотеці Львівського національного університету ветеринарної медицини та  
біотехнологій імені С. З. Гжицького за адресою: 79010, м. Львів, вул.  
Пекарська, 50.

Реферат розіслано « 16 » березня 2023 р.

**Учений секретар**  
**спеціалізованої вченої ради**

**М.І. Леньо**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Розробка ефективних та екологічно безпечних фармакологічних препаратів для лікування корів за маститу, які активно діють проти антибіотикостійких штамів бактерій, досі є актуальною (Gomes F. та Henriques M., 2015; Гуфрій Д.Ф., 2015; Gufrij D. et al., 2017; Сачук Р.М., 2019; Ruegg P.L., 2021). Золотистий стафілокок вважається одним із основних збудників маститу корів у всьому світі (Tuchscher L. et al., 2010; Pellegrino M. et al., 2017; Roshan M. et al., 2022). Особливістю стафілококового маститу є високий ризик передачі *S. aureus* між тваринами та здатність збудника зберігатися у вимені корів у формі субклінічної інфекції (Peralta O.A. et al., 2020; Ciofu O. et al., 2022). 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 (Kukhtyn M.D. et al., 2017; Valemi A. et al., 2021). Традиційне лікування стафілококового маститу у період лактації корів та у сухостої вимагає застосування протимікробних засобів (Ruegg P.L., 2017). Ефективність фармакологічних антибактеріальних препаратів за маститу корів у сухостійний період досягає 78 % (Oliver S.P. та Murinda S.E., 2012; Zhao X. et al., 2020), у той же час, ефективність застосування цих самих препаратів у період лактації значно нижча і сягає лише 20 – 40 % (Ciofu O. et al., 2022). 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 цефотоксину (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 (Yengkho R. et al., 2019; El-Ashker M. et al., 2020; Tóth A.G. et al., 2020). 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 (Гунчак В.М., 2013). 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 (Abedon S., 2020; Laanto E. et al., 2020). Бактеріофаги – це природні віруси, які проявляють високу специфічність до бактеріального хазяїна (de la Fuente-Núñez C. et al., 2013; Sillankorva S. та Azeredo J., 2014; Wills Q.F. et al., 2015). 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 (Carlton R.M. et al., 2005; Kim M. et al., 2018). Глобальне зацікавлення до

терапії фагами проявляється у зростаючій кількості останніх клінічних випробувань із застосуванням перорального, внутрішньовенного або місцевого застосування фагів (Kasman L.M., et al. 2002; Abedon S., 2011; Huys I. et al., 2013; Tavares T.D. et al., 2020).

Низька ефективність антибіотикотерапії за субклінічної форми маститу у корів ще пояснюється здатністю збудників формувати щільні біоплівки (Kukhtyn M. et al., 2017; Suresh M.K. et al., 2019). Тому дія антибактеріальних препаратів має бути направлена на руйнування мікробних плівок або здатності препаратів 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 (Dias R.S. et al., 2013; Milho C. et al., 2019). 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 (Tkhilaishvili T. et al., 2018; Svircev A. et al., 2018).

Значна кількість фагів мають здатність продукувати полісахаридні деполімерази. 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 (Latka A. et al., 2017). Власне тому, за розробки фагових препаратів, особливо для лікування хронічних захворювань, таких як субклінічний мастит, необхідно виділяти і культивувати літично активні 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 мастит корів, який завдає значні економічні збитки через розвиток антибіотикорезистентності у збудників та необхідність бракування молока. 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 SA<sub>v</sub>B14*, 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 SA<sub>v</sub>B14* 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 SA<sub>v</sub>B14* 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 внутрішньоцистернальний 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, сенсibiliзуювальними 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/см<sup>3</sup> у препараті зміни рухової активності та патологічних відхилень у клітинах інфузорій не виявлено. 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 SA<sub>v</sub>B14*. Встановлено, що *Phage SA<sub>v</sub>B14* 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 SA<sub>v</sub>B14* ефективно проникає у матрикс біоплівки та знищує плівкоутворювальні збудники маститу *S. aureus var. bovis* і може бути використаний сукупно з антибіотиками. Штам бактеріофага *Phage SA<sub>v</sub>B14* 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 SA<sub>v</sub>B14* 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 задепоновано штам *Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f*, який є типовим збудником маститу в корів (Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії ДНКІБШМ № 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 обґрунтовано 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 дозволить, з одного боку, ефективно ліквідувати основного збудника маститу золотистого стафілококу, з іншого – зменшить 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 SA<sub>v</sub>B14* (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 цифрового 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); I 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.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Дисертаційна робота виконувалася на факультеті ветеринарної медицини та технологій у тваринництві Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» протягом 2017 – 2022 р. 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.

**Матеріали досліджень.** Під час визначення чутливості виділених бактерій до протимікробних препаратів досліджено бактерицидну дію у 10 антибіотиків, у 25 протимаститних внутрішньоцистернальних препаратів, у 2 промислових фагових препаратів, зареєстрованих в Україні. Під час створення препарату Фагомаст виділено 17 штамів стафілококових бактеріофагів, досліджено 3 дослідних варіанти препарату з різними титрами. При вивченні збудників маститу корів досліджено 1780 зразків секрету молочної залози хворих тварин, ідентифіковано та визначено основні властивості в 23 штамів роду *Staphylococcus*, перспективних господарів для нарощування фагів.

**Етапи проведення досліджень.** Основним напрямком роботи було експериментально розробити фаговий препарат Фагомаст та обґрунтувати використання фаготерапії за лікування корів, хворих на мастит, як альтернативи антибіотикам.

На **першому етапі роботи** було проведено аналіз антибіотиків та внутрішньоцистернальних 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.

**Другий етап** роботи – виділення та дослідження бактеріофагів для створення протимаститного 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 SA<sub>v</sub>B14* на біоплівки, які сформовані *Staphylococcus aureus var. bovis*, як самостійного антибактеріального агента та в комплексі з антибіотиками.

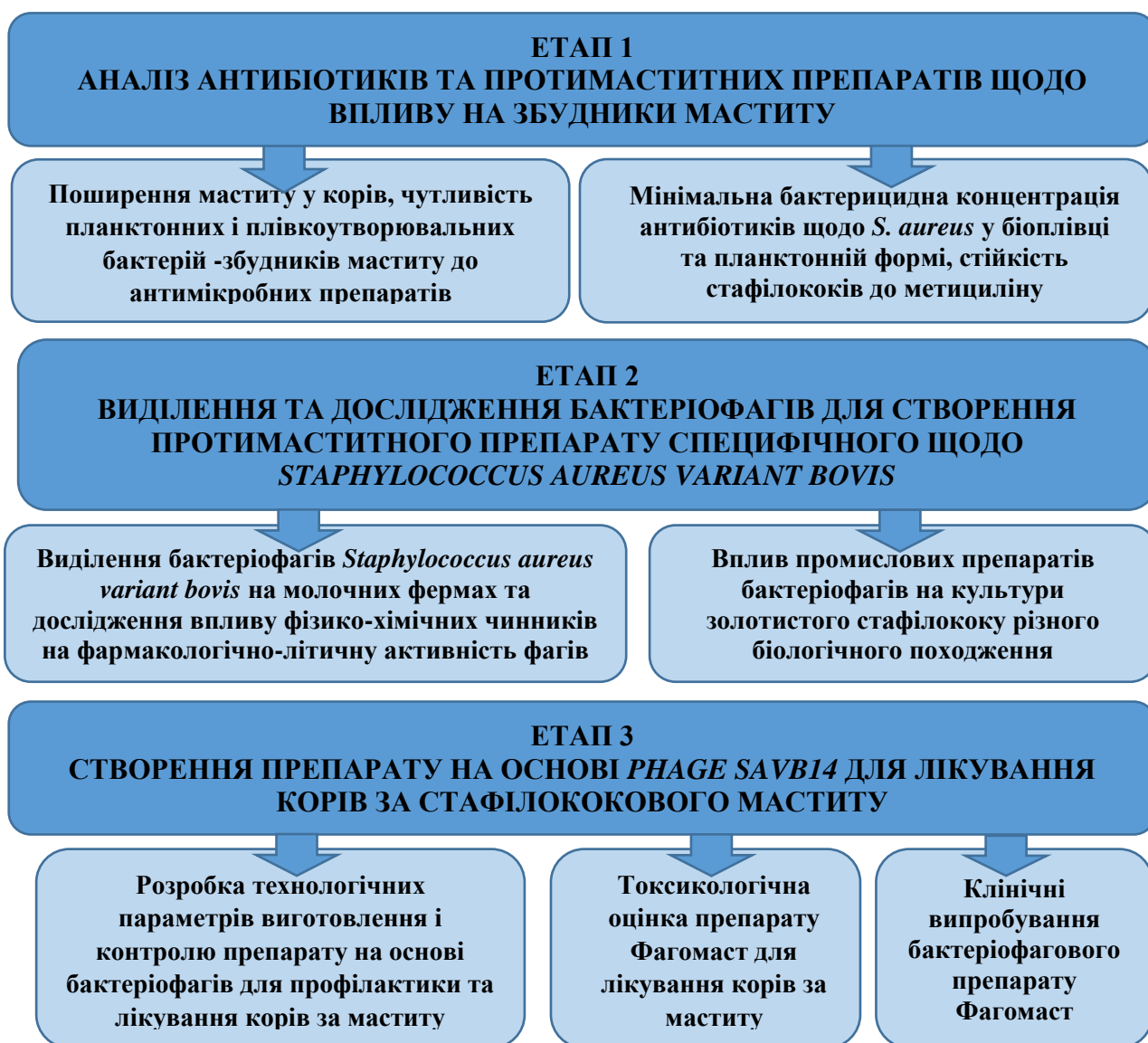


Рис. 1. Схема проведення досліджень дисертаційної роботи

**Третій етап** експериментальних досліджень включав визначення технологічних параметрів для створення препарату і використання Фагомасту з лікувальною метою у 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 (подроздразнювальної) 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.

**Фармако-токсикологічні методи.** Визначення мінімальної інгібуючої концентрації антибіотиків на планктонних та плівкоутворювальних мікроорганізмах проводили згідно стандартних методик (Roupard J., 2013). Вивчення чутливості мікроорганізмів, що перебувають у біоплівковій формі, до антибіотиків проводили на добових мікробних біоплівках, які вирощені у пластикових чашках Петрі (Кухтин М. та ін., 2020).

Визначення токсичності препарату проводилось у лабораторії Тернопільської дослідної станції Інституту ветеринарної медицини НААН. Дослідження проводили згідно чинних методик (Коцюмбас І. Я. та ін., 2006). Клінічні дослідження проводились згідно з етичними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р).

Експериментальні дослідження проводили на білих мишах. Для досліду було взято піддослідні тварини з середньою масою тіла 25 – 30 г, віком 18 – 20 тижнів. Обрахунок результатів проводили за методом Кербера. Дослід з визначення гострої токсичності тривав 14 діб. Протягом досліду спостерігали за поведінкою тварин, фіксували кількість загиблих у кожній групі.

Загальні клінічні спостереження проводились щодня. Оцінювали клінічні особливості, включаючи зміни серцево-судинної, дихальної, травної, сечовидільної систем. Після 14 діб застосування препарату 18 мишей (по 6 тварин з кожної групи) піддавали евтаназії та проводили патологоанатомічний розтин. 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 загальноновизнаних методик (Patra J.K. et al., 2019).

Оцінку шкідливої дії (місцевоподразнювальну) 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.

Стерильність препарату Фагомаст кожної партії перевіряли шляхом інокуляції 1 см<sup>3</sup> в 5 см<sup>3</sup> стерильного м'ясопептонного бульйону, який інкубували за температури 37 °С та спостерігали за помутнінням бульйону

протягом 48 годин, після чого проводили відсів на чашки Петрі з м'ясосептонним агаром.

**Мікробіологічні методи.** Для виділення мікроорганізмів проводили посіви проб на середовища: стафілококів – *BD Baird-Parker Agar* (HiMedia, Індія); *MRSA* – хромогенне середовище Агар chromID MRSA (HiMedia, Індія); коліформних бактерій – агар Ендо (Фармактив, Україна), стрептококів – *Streptococcus Selection Agar* (HiMedia, Індія). Ідентифікацію чистих культур проводили за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями, які описані у визначнику бактерій Берджі. Також ідентифікацію культур стафілококів проводили з використанням наборів «RapID Staph Plus» (Oxoid, Велика Британія). Чутливість бактерій до антибактеріальних препаратів визначали диско-дифузійним методом, використовуючи диски з антибіотиками (HiMedia, Індія), а 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).

Визначення плівкоутворювальних властивостей збудників маститу проводили за методикою (Stepanović S. et al., 2000; Кухтин М. та ін., 2020). Електронно-мікроскопічні дослідження біоплівки проводили на електронному растровому мікроскопі (РЕМ 106 И, Україна). Для визначення патогенних властивостей *S. aureus* проводили тести на коагулазу, продукцію ДНК-ази, лецитинази, гемоліз (Maurin F. et al., 2004). 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) згідно інструкції. У культур, що належать до *S. aureus*, біотип визначали використовуючи схему: визначення кольору пігменту, наявність бета-гемолізу, активність коагулази до бичачої плазми, утворення колоній на середовищі з кристалічним фіолетовим (Mayer J. D., 1999).

Матеріалом для дослідження (виділення бактеріофагів) були зразки секрету молочної залози корів із клінічними ознаками маститу та стічні води. У подальшому отримання чистих ліній бактеріофагів проводили за методикою, розробленою Oliveira et al. (Merabishvili M. et al., 2009). Для визначення тривалості латентного періоду використовували спосіб вивчення одиночного циклу розмноження фага (Shoda M., 2019).

Визначення діапазону дії бактеріофагів, щодо клінічних ізолятів мікроорганізмів, проводили крапельним методом. Оцінку ступеню лізису проводили по чотирьох хрестах, де «++++» – зливний (повний) лізис; «+++» – напівзливний лізис, ріст культури в зоні лізису; «++» – наявність в місці нанесення краплі фага понад 50 колоній фага (плям лізису); «+» – наявність у місці нанесення краплі фага від 20 до 50 колоній фага; «+/-» – наявність в місці нанесення краплі фага менше 20 колоній фага; «-» – повна відсутність лізису.

Для визначення впливу температур, хлороформу та коливань рН середовища на активність бактеріофагів використовували методики, описані Merabishvili M. et al. (2009). За вивчення впливу бактеріофагу на сформовані

біоплівки визначали: оптичну густина біоплівки, кількість клітин стафілококів у біоплівці та титр бактеріофагів. Ефект комбінованого застосування фагу з антибіотиками оцінювали при одночасному та поетапному внесенні антибіотиків та бактеріофагу на відміту 24-годинну біоплівку. Титр бактеріофагів визначали за методом Грація.

Для оцінки впливу кількості життєздатних бактерій *Staphylococcus aureus var. bovis* на інтенсивність фагової інфекції, спричиненої бактеріофагом *Phage SA<sub>v</sub>B14*, вносили 1 см<sup>3</sup> фаголізату з титром фагів 10<sup>5</sup> БУО/см<sup>3</sup> у 9 см<sup>3</sup> 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 методик, описаних раніше.

**Клінічні методи.** Схема лікування корів препаратом Фагомаст включала інфузію 10 см<sup>3</sup> препарату, яку задавали після здоювання двічі на добу. Після введення препарату молочну залозу масажували поступальними рухами вгору для кращого розподілення діючої речовини в залозі. Огляд та клінічні дослідження молочної залози проводили протягом періоду лікування. Визначення показників крові проводили на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі BS3000M (SINNOWA Medical Science & Technology Co., LTD, Китай) згідно інструкції.

**Статистичну обробку** результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) та ANOVA. Визначали середнє арифметичне ( $\bar{x}$ ), стандартну похибку середньої величини (SE). Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за  $p < 0,05$  (з урахуванням корекції Бонферроні).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

**Аналіз антибіотиків та протимаститних препаратів щодо впливу на збудники маститу.** Упродовж 2017 – 2021 років нами вивчено поширення маститу корів на молочних фермах західного регіону України. Встановлено, що мастит діагностується у субклінічній формі у 29,4 % корів під час лактації, водночас, клінічну форму діагностували у 4,6 разів ( $p < 0,05$ ) менше. За цих умов найчастіше збудниками маститу були бактерії роду *Streptococcus* (47,7 %) та *Staphylococcus* (45,5 %), що вказує про їх головну етіологічну роль у виникненні субклінічного маститу. Серед коагулазопозитивних стафілококів за маститу домінував вид *S. aureus subsp. aureus*, який виділявся у 93,3 %. Власне, це той вид, який ідентифікується як *S. aureus var. bovis*.

Визначення чутливості основних збудників маститу корів до сучасних антимікробних препаратів, найбільш поширених у ветеринарній медицині, показало, що найефективнішим виявився цефалоспорин III покоління – цефтріаксон, до якого були чутливі усі виділені стрептококи та епідермальні стафілококи, а чутливість штамів *S. aureus* становила 95,2 %. Чутливість стрептококів до бензилпеніциліну становила від 32,3 до 45,4 %, в той же час *S. aureus* був стійкішим – кількість чутливих штамів становила 19,0 %. Протимікробна активність амоксициліну була вища, ніж бензилпеніциліну,

так кількість 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 відзначити досить високу протимікробну активність у антибіотика тетрациклінового ряду – доксицикліну. Кількість чутливих до даного антибіотика стрептококів коливалася в межах 80,9 – 100 %, а чутливість стафілококів становила 95,2 %. Водночас, чутливість збудників маститу до тетрацикліну була в 4,5 разів ( $p < 0,05$ ) меншою, порівняно з доксицикліном.

Також встановлено, що серед усіх ідентифікованих стафілококів виявлялися види, стійкі до метициліну. Найбільша частка стійких культур була виявлена у виду *S. hominis* – 33,3 %, тоді, як *S. aureus* проявляв стійкість у 1,2 рази ( $p < 0,05$ ) меншу, порівняно з *S. hominis*. Усі 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.

Отже, за результатами досліджень виявили, 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. Властиво, це вимагає пошуку нових засобів для лікування стафілококових інфекцій тварин.

**Вплив антибіотиків на плівкоутворювальні бактерії-збудники маститу.** Встановлено, що мікроорганізми *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. aureus* та *S. epidermidis* є основними збудниками маститу корів на молочних фермах. Дослідження формування мікробних біоплівки збудниками маститу виявило, що найбільшу кількість плівкоутворювальних штамів *S. aureus* виділяли за субклінічної форми маститу – 96,7 %. Важливо виділити, що за клінічної форми 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 рази ( $p < 0,05$ ) більша, ніж при клінічній формі. Однак, штами *S. aureus*, що є збудниками маститу корів, у 1,4 – 1,5 рази ( $p < 0,05$ ) 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 за стрептококового маститу.

Дослідження впливу антибіотиків на бактерії, які сформовані у біоплівки показало, що вони проявляли бактерицидну дію на бактерії у біоплівці, проте, клітини виявлялися життєздатними на рівні вище «порогу інфікованості» (табл. 1). Найбільш захищені біоплівкою були клітини *S. aureus*, а з досліджених антибіотиків 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/см<sup>2</sup> площі біоплівки, а стафілококи виділялися у кількості 5,0 – 6,0 lg КУО/см<sup>2</sup> площі біоплівки. За умови дії антибіотиків аміноглікозидів і макролідів кількість мікробних клітин, що вижили, не перевищувала 5,3±3,2 lg КУО/см<sup>2</sup> площі біоплівки. Досить ефективними на бактерії у біоплівках виявилися антибіотики цефтріаксон і доксициклін. Після дії цефтріаксону кількість бактерій, що вижила, становила lg 1,9±1,1 КУО/см<sup>2</sup> площі біоплівки, а доксицикліну – 2,5±1,2 lg КУО/см<sup>2</sup>.

Таблиця 1

**Вплив антибіотиків на бактерії у складі біоплівки, lg КУО/см<sup>2</sup>, x±SE**

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

У табл. 2 наведено результати досліджень щодо кількісного вмісту *S. aureus* у біоплівці після впливу антибіотиків у мінімально бактерицидній концентрації (МБК), визначеній на планктонних формах. До того ж виявлено, що мінімальна бактерицидна концентрація антибіотиків, яка впливає на планктонні форми, не знищує мікробні клітини у біоплівці. Відзначається поступове зростання кількості мікробних клітин у складі біоплівки по мірі зниження концентрації антибіотиків. Кількість клітин у біоплівці, сформованій *S. aureus* за найвищої дії мінімально бактерицидної концентрації, 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 мінімально бактерицидної концентрації виявилася тільки в 25 разів меншою, порівняно з кількістю клітин у біоплівці в контролі (до дії антибіотика). Саме це вказує, що існуючи у матриці біоплівки, золотистий стафілокок практично недоступний до дії антибіотиків, не дивлячись на високу чутливість планктонних клітин до цих антибіотиків.

Таблиця 2

**Вплив антибіотиків на кількість бактерій у складі біоплівки, Ig КУО/см<sup>2</sup>,  $\bar{x} \pm SE$ , n =81**

Концентрація антибіотиків, мг/см <sup>3</sup>	Тетрациклін		Енрофлоксацин		Амоксицилін / клавулонова кислота		Гентаміцин	
	Кількість культур, n=11	Кількість <i>S. aureus</i>	Кількість культур, n=14	Кількість <i>S. aureus</i>	Кількість культур, n=8	Кількість <i>S. aureus</i>	Кількість культур, n=48	Кількість <i>S. aureus</i>
12,5	2	2,8±1,2	-	0	-	0	5	2,8±1,4
6,2	1	3,6±2,5	-	0	-	0	1	2,8±1,7
3,1	1	5,5±4,5	-	0	-	0	3	4,3±3,2
1,5	3	5,9±4,8	-	0	-	0	26	4,9±3,8
0,8	2	7,0±5,9	1	2,1±1,5	1	1,8±1,3	8	6,0±4,9
0,4	2	7,2±5,5	2	4,6±3,5	4	4,2±3,1	5	6,3±5,1
0,2	-	0	9	5,1±4,0	1	4,9±3,9	-	0
0,1	-	0	1	5,9±4,8	1	5,8±4,7	-	0
0,05	-	0	1	6,1±5,0	1	5,9±4,9	-	0
До впливу антибіотика	-	9,0±7,9	-	9,0±7,9	-	9,0±7,9	-	9,0±7,9

Мінімально бактерицидна концентрація антибіотиків амоксициліну з клавулановою кислотою і енрофлоксацину значно сильніше діяла на клітини *S. aureus* у біоплівці, порівняно з тетрацикліном і гентаміцином. Після дії найвищої мінімально бактерицидної концентрації (0,8 мг/см<sup>3</sup>) даних антибіотиків кількість клітин у біоплівці становила 1,8±1,3 і 2,1±1,5 Ig КУО/см<sup>2</sup> змиву, відповідно. Також відзначаємо найменшу кількість



клітин *S. aureus* у біоплівці після дії найнижчої мінімально бактерицидної концентрації амоксициліну ( $5,9 \text{ Ig КУО/см}^2$ ), порівняно до впливу інших антибіотиків.

Отже, 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. Власне тому, з метою обґрунтування ефективності лікування маститу необхідно підбирати таку концентрацію протимікробних препаратів, яка ефективно діє на мікробні клітини, сформовані у біоплівки.

**Передумови та підбір методики для створення протимаститного препарату специфічного щодо *S. aureus var. bovis*.** Приступаючи до розробки бактеріофагового препарату, активного щодо *S. aureus var. bovis* – збудника маститу корів, нами було вивчено фармакологічно-літичну активність препаратів бактеріофагів промислового виробництва, які наявні на ринку України щодо стафілококів різного біологічного походження (табл. 3). Встановлено, що препарати промислового виробництва (Стафілококовий бактеріофаг® та Інтестіфаг®) не лізували культури, виділені з секрету молочної залози корів та культури, виділені з молочних продуктів на агропромислових ринках.

Таблиця 3

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

Походження штамів	Кількість культур, n	Досліджені препарати	
		Стафілококовий бактеріофаг®	Інтестіфаг®
Культури, виділені з секрету вимені корів за маститу	96	0	0
Культури, виділені з молочних продуктів	26	0	0
Культури, виділені з біотопів людини	74	25,6±2,5	91,8±8,2
Музейні штами: <i>S. aureus</i> №209-Р, <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	2	0	100

Вузька специфічність фагів указує на необхідність постійного пошуку нових ізолятів для використання їх із терапевтичною метою. Якраз тому було обрано для нарощування титрів бактеріофагів виділений нами штам золотистого стафілококу (*Staphylococcus aureus var. bovis 1491 f*), який є типовим збудником маститу у корів та циркулює на молочних фермах. Вплив фізичних та хімічних факторів на культуру *S. aureus var. bovis 1491 f* не спричиняли індукцію профагу в бактеріальній клітині. Даний штам був використаний для нарощування титру типових бактеріофагів для подальшого розроблення фагового препарату.

Порівняння методів очищення фаголізату від сторонньої мікрофлори показали, що найефективнішим методом є багатоступенева фільтрація. 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.

**Виділення бактеріофагів та вплив на їх фармакологічну активність фізико-хімічних чинників при створенні препарату.** Під час створення бактеріофагового препарату для лікування маститу було виділено стафілококові фаги з секрету корів, хворих маститом, стічних вод (гноївки). Встановлено, що найбільш широким спектром літичної активності проявляли штами *Phage SA $\nu$ B07*, *Phage SA $\nu$ B08*, *Phage SA $\nu$ B12* та *Phage SA $\nu$ B14*, які знищували культури золотистих стафілококів у 54,2 – 92,7 % випадків. Саме тому вони були обрані для подальших досліджень. Характеристика негативних колоній виділених фагів наведена в табл. 4.

Таблиця 4

#### Характеристика негативних колоній виділених фагів

Досліджені фаги	Діаметр негативних колоній, мм	Форма негативних колоній	Ступінь прозорості	Характер країв колоній
<i>Phage SA<math>\nu</math>B07</i>	1,0 $\pm$ 0,1	кругла	напівпрозора	рівний
<i>Phage SA<math>\nu</math>B08</i>	1,5 $\pm$ 0,1	кругла	напівпрозора	рівний
<i>Phage SA<math>\nu</math>B12</i>	2,0 $\pm$ 0,1	кругла	напівпрозора	рівний
<i>Phage SA<math>\nu</math>B14</i>	1,5 $\pm$ 0,1	кругла	прозора	рівний

При оцінці форми колоній виділених фагів та характеристиці 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 *SA $\nu$ B14*, у якого зона була прозора. Діаметр колоній фагів становив від 1,0 до 2,0 мм, найменші колонії були у фага *SA $\nu$ B07* 1,0 $\pm$ 0,1мм, а найбільший діаметр – у фага *SA $\nu$ B12* 2,0 $\pm$ 0,1 мм. Фаг, який утворював прозору колонію (*SA $\nu$ B14*) мав діаметр 1,5 $\pm$ 0,1 мм.

Штами бактеріофагів із коротким латентним періодом та з великою кількістю віріонів після руйнування бактеріальної клітини вважаються ідеальними для створення терапевтичних засобів. Встановлено (рис. 2 А, Б), що у фагів *SA $\nu$ B07* і *SA $\nu$ B08* 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 log БУО/см<sup>3</sup>.

У фага *SA $\nu$ B12* (рис. 2 В) латентний період часу збільшився в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ) порівняно з фагами *SA $\nu$ B07* і *SA $\nu$ B08* і становив 60 хв. За цих умов кількість віріонів також зростала на два порядки. Фаг *SA $\nu$ B14* також мав короткий латентний період дії у 35 хв, проте він спричиняв вивільнення великої кількості віріонів, яка становила 12 lg БУО/см<sup>3</sup>. Властиво це дає підставу вважати, що відбувається інфікування і руйнування великої кількості клітин стафілококів. Якщо порівнювати криві росту виділених фагів, то бактеріофаги *SA $\nu$ B07*, *SA $\nu$ B08* і *SA $\nu$ B12* можна віднести до помірних, оскільки проходив лізис окремих мікробних клітин стафілококів та вивільнення незначної кількості віріонів. Одночасно, фаг *SA $\nu$ B14* мав короткий латентний

період та на 6 порядків більше спричиняв вивільнення віріонів, ніж фаги *SAvB07*, *SAvB08* і *SAvB12*.

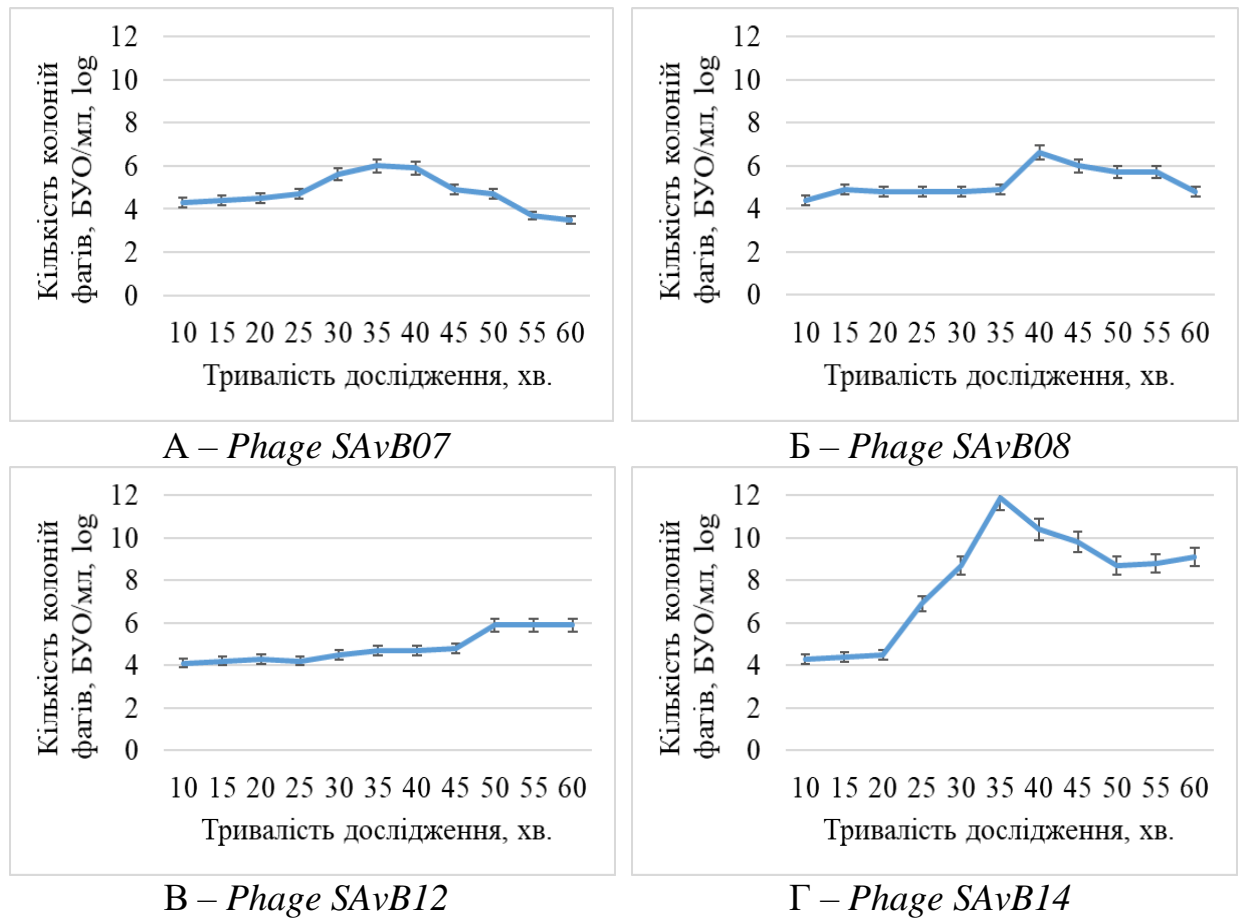


Рис 2. Крива росту бактеріофагів, тут і на наступних рисунках дані наведені як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення

Отже, проведені дослідження 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 із вивільненням великої кількості віріонів. Такі характеристики роблять його перспективнішим штамом для створення препарату для лікування маститу.

Встановлено (рис. 3), що кількість активних фагів за впливу температури 45 °C протягом перших 10 хвилин знизилася на 40,7 – 27,6 %. Лише кількість активного фагу *Phage SAvB14* була майже незмінною. Температура 55 – 65 °C 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. У 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. Також встановлено, що усі досліджувані фаги (*Phage SAvB07*, *Phage SAvB08*, *Phage SAvB12*, *Phage SAvB14*) виявилися чутливими до зміни

pH середовища (рис. 4). Найбільшу стабільність вони проявили при значенні pH середовища в межах 6 – 7 од, тобто близьке до нейтрального. Титр бактеріофагів за впливу на них хлороформу (концентрація 10 %) протягом 45 хвилин майже не змінювався. Саме тому можна вважати, що штами бактеріофагів *Phage SAvB07*, *Phage SAvB08*, *Phage SAvB12*, *Phage SAvB14* стійкі до хлороформу.

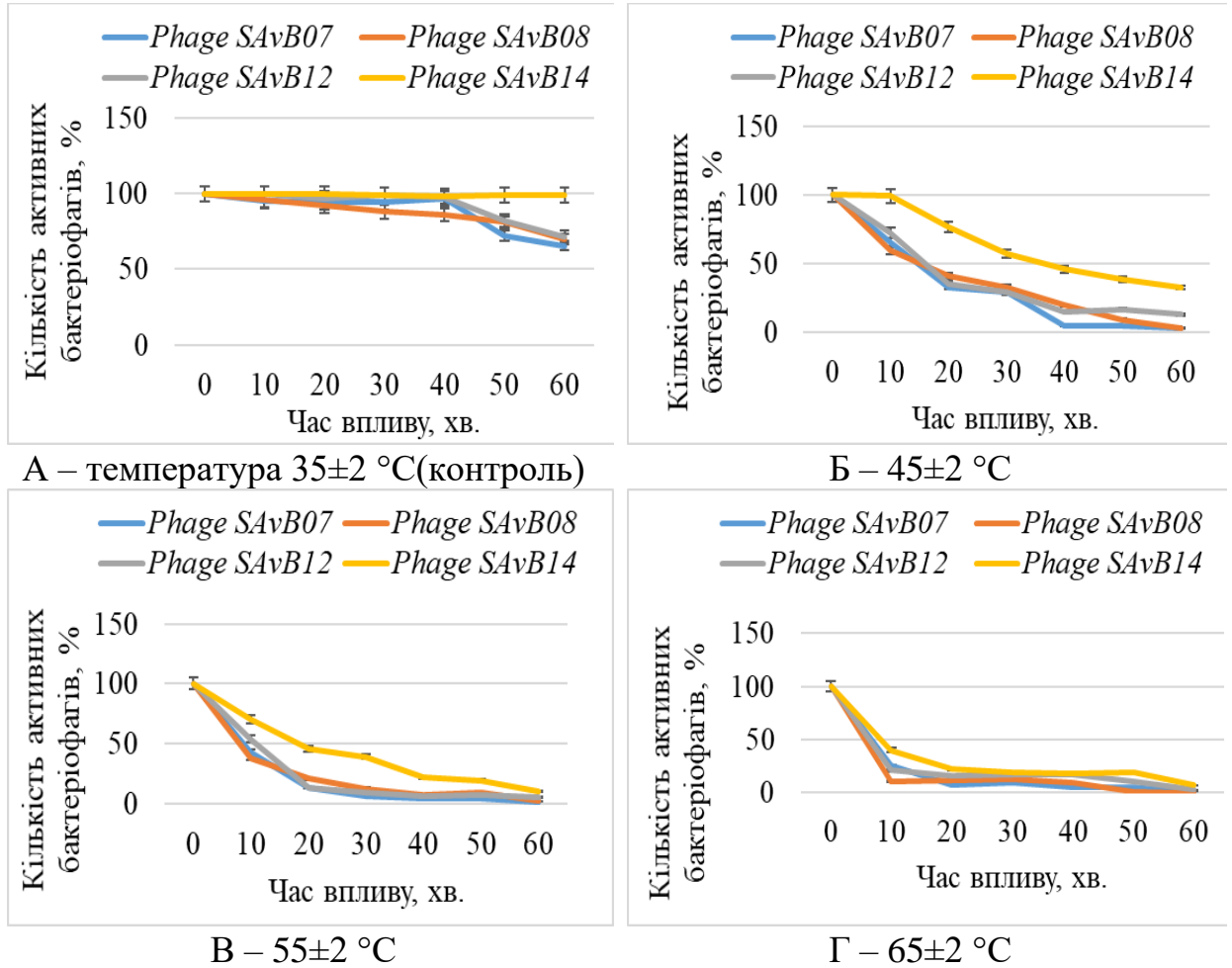


Рис. 3. Вплив температури на літичну активність бактеріофагів

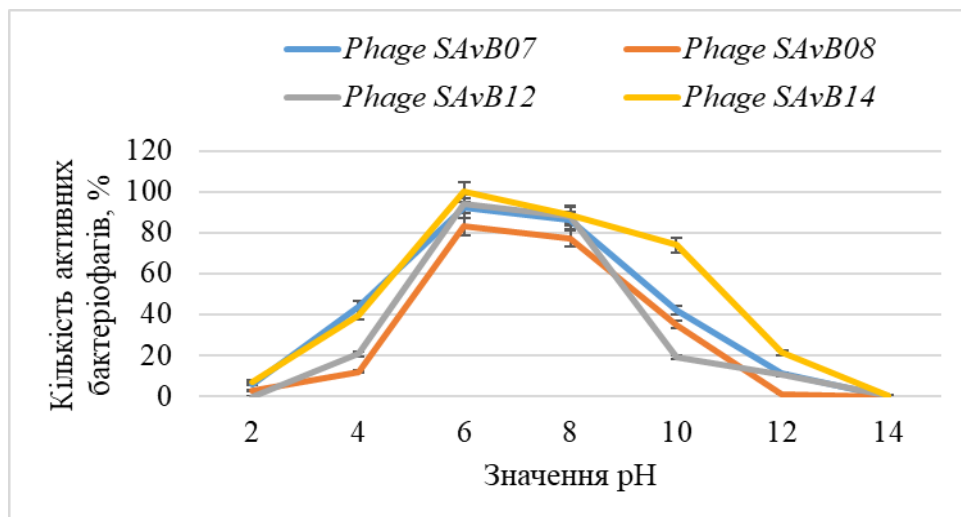


Рис. 4. Вплив pH середовища на літичну активність бактеріофагів

Отже, проведені дослідження визначили оптимальні умови для зберігання фагової активності. Відхилення від стандартних умов зберігання фагів призводить до різкого зниження фагової активності. Проте, фаг *Phage SA $\nu$ B14* значно стійкіший до впливів високих температур, коливання рН середовища та хлороформу порівняно з іншими дослідженими фагами, а тому є кращим для створення препарату для лікування корів за стафілококового маститу.

**Фармакологічна дія різних титрів *Phage SA $\nu$ B14* на кількість *Staphylococcus aureus variant bovis*.** Існує ряд специфічних особливостей щодо динаміки комплексу фаг-бактерія, які необхідно враховувати при розробці фагового препарату. Встановлено, що титр бактеріофагів прямопропорційно впливав на кількісний вміст *S. aureus var. bovis* (рис. 5).

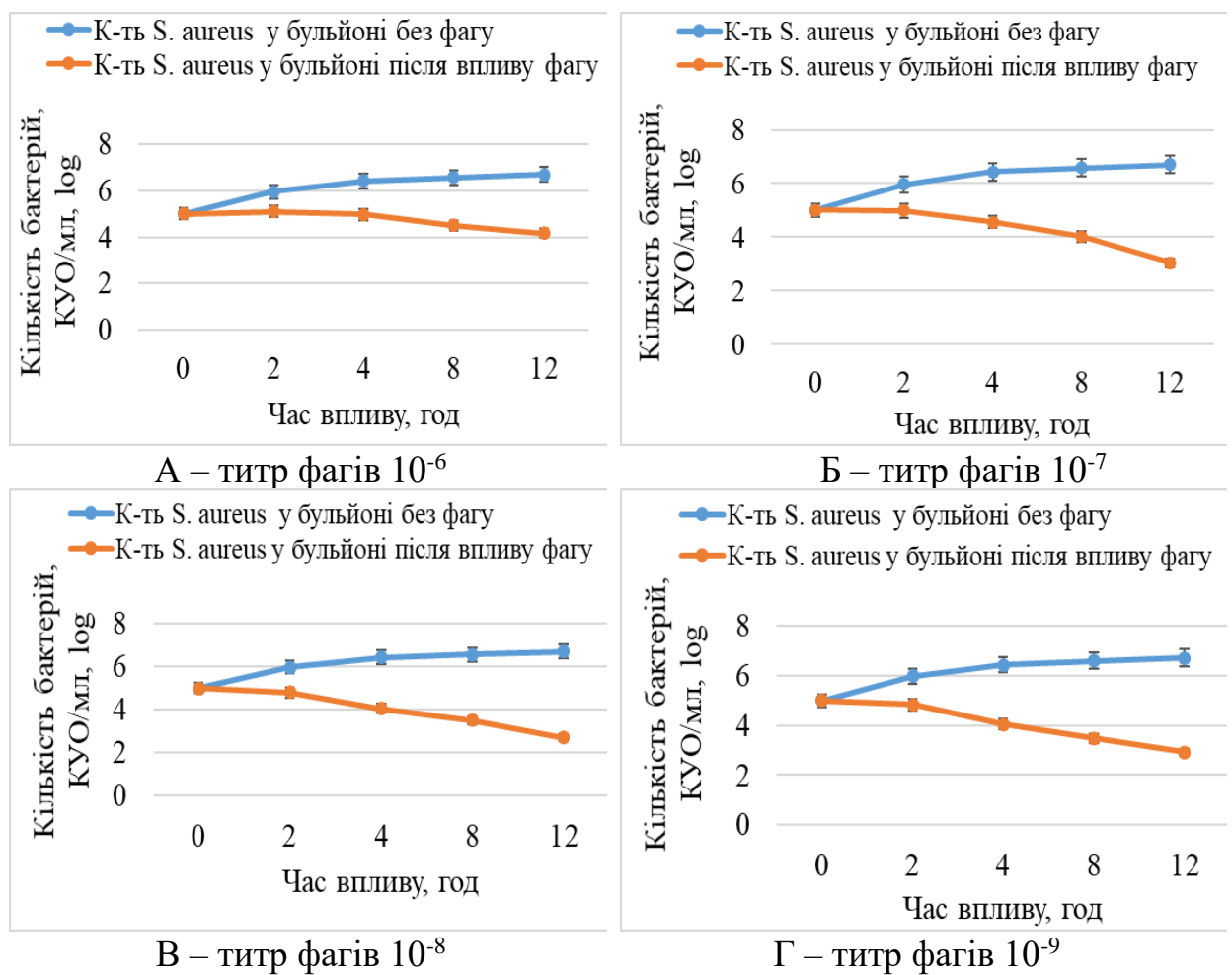


Рис. 5. Вплив різних титрів бактеріофагів на кількість життєздатних клітин *S. aureus var. bovis*

Вміст золотистого стафілококу вже протягом перших двох годин взаємодії з літичними фагами *SA $\nu$ B14* зменшувався. Так, кількість життєздатних клітин бактерій за титру  $10^{-6}$  БУО/мл зменшилася у 1,2 раза ( $p < 0,05$ ), при титрі  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  та  $10^{-9}$  БУО/мл – приблизно у 1,3 раза ( $p < 0,05$ ). Проте, за збільшення часу взаємодії виявляли закономірність, 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 за титру  $10^{-8}$  БУО/мл була меншою у 1,5 та 1,1 раза ( $p < 0,05$ ), ніж при титрах  $10^{-6}$  та  $10^{-7}$  БУО/мл відповідно.

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

Отже, за розробки препарату на основі бактеріофагів необхідно використовувати фаголізат із титром не менше  $10^8$  БУО/мл. Введення такої кількості фагів може забезпечити необхідний фармакологічний ефект за лікування тварин від захворювань, спричинених *S. aureus var. bovis*.

**Інтенсивність фармаколітичної дії *Phage SAvB14*, залежно від кількості чутливих клітин.** Результати досліджень із визначення впливу бактеріофагу *Phage SAvB14* на штами чутливих бактерій *S. aureus var. bovis* 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/см<sup>3</sup>. За цей же 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/см<sup>3</sup> 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 відзначається і за більшої початкової кількості *S. aureus* у середовищі ( $10^4 - 10^5$  КУО/см<sup>3</sup>). За такого початкового вмісту мікробних клітин дія фагу протягом двох годин зумовила зменшення кількості стафілококів, в середньому, в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ). Якраз це вказує на лізис бактерій через швидке поширення фагової інфекції серед стафілококів.

У живильному середовищі з початковою кількістю *S. aureus*  $1,0 \pm 0,002 \times 10^5$  КУО/см<sup>3</sup> відзначали в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) швидшу загибель мікробних клітин, порівняно з середовищем з кількістю  $5,0 \pm 0,1 \times 10^2$  КУО/см<sup>3</sup> та в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) швидшу, порівняно з кількістю  $1,0 \pm 0,07 \times 10^3$  КУО/см<sup>3</sup>. За початкового вмісту *S. aureus* у живильному бульйоні  $1,0 \pm 0,008 \times 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> інтенсивність поширення фагової інфекції також була в 1,5 та 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) швидша, ніж у бульйоні з кількістю стафілококів  $5,0 \pm 0,1 \times 10^2$  КУО/см<sup>3</sup> та  $1,0 \pm 0,07 \times 10^3$  КУО/см<sup>3</sup> відповідно. Це вказує на те, що за більшої кількості мікробних клітин у середовищі відбувається швидший контакт вірусу і бактерії, це посилює інтенсивність поширення фагової інфекції.

Одночасно, упродовж 24 та 48 год впливу фагу на мікробні клітини у варіантах дослідів з початковою кількістю *S. aureus* до  $1,0 \pm 0,008 \times 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> відбувся повний лізис бактерій і стафілококів із живильного середовища не виділяли.

Отже, при підборі бактеріофагу в певній дозі та концентрації необхідно враховувати особливості взаємодії фаг-бактерія для забезпечення ефективного лікування.

**Фармакологічна активність виділених бактеріофагів *Staphylococcus aureus variant bovis* щодо культур золотистого стафілококу різного біологічного походження.** Встановлено, що бактеріофаги (*Phage SA<sub>v</sub>B14*, *Phage SA<sub>v</sub>B12*, *Phage SA<sub>v</sub>B08*, *Phage SA<sub>v</sub>B07*), які виділені на молочних фермах, характеризуються певною специфічністю літичної дії відносно стафілококів, виділених із різних біотопів. Так, найбільшу кількість чутливих клітин стафілококів відзначали за дії бактеріофага *Phage SA<sub>v</sub>B14*, даний фаг діяв літично на  $92,7 \pm 8,3$  % золотистих стафілококів, виділених з секрету молочної залози корів з клінічними ознаками маститу. За цих умов *Phage SA<sub>v</sub>B14* проявляв активну літичну дію щодо стафілококів у людей лише у  $35,1 \pm 3,1$  % випадків та не впливав на музейні штами. Менш активними щодо стафілококів, виділених з різних біотопів, виявилися інші досліджені бактеріофаги. Зокрема, *Phage SA<sub>v</sub>B12*, *Phage SA<sub>v</sub>B08*, *Phage SA<sub>v</sub>B07* 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 SA<sub>v</sub>B14*. Незначну антистафілококову дію відзначали у *Phage SA<sub>v</sub>B12* – він лізував  $16,2 \pm 1,3$  % культур, виділених з біотопів людини. Також виділені на молочних фермах фаги (*Phage SA<sub>v</sub>B12*, *Phage SA<sub>v</sub>B08*, *Phage SA<sub>v</sub>B07*) не проявляли активності щодо музейних штамів *S. aureus* №209-Р, *S. aureus* (АТСС 25923) та золотистих стафілококів, виділених з біотопу людини.

Встановлено, що виділені нами бактеріофаги здатні інфікувати не лише *S. aureus*, але і інші види стафілококів. Одночасно, найбільш літично активний серед виділених фагів був *Phage SA<sub>v</sub>B14*, за дії якого лізувалися від 41,5 до 62,1 % ідентифікованих культур коагулазонегативних стафілококів. За цих умов такі види як *S. saprophyticus* і *S. xylosus*, в середньому, в 60 % виявилися чутливими до *Phage SA<sub>v</sub>B14*. В якості додаткового господаря для його реплікації можна використовувати *S. xylosus*, який є непатогенним.

**Антимікробна дія бактеріофагу *Phage SA<sub>v</sub>B14* на біоплівки, сформовані *Staphylococcus aureus variant bovis*.** За впливу бактеріофагу на зрілі 72-годинні біоплівки їх деградація відбувається досить інтенсивно. Зокрема, упродовж 4-ох годин взаємодії бактеріофагу і клітин стафілококів у біоплівці зміни кількості бактерій не відбувалося, а кількість бактеріофагів зросла на два порядки (табл. 5). Через 8 годин контакту вірусу і бактерій розпочався процес лізису мікробних клітин і їх кількість зменшилась на один порядок, а кількість бактеріофагів зросла до  $1,1 \pm 0,2 \times 10^9$  БУО/см<sup>3</sup>. На 12 годину впливу бактеріофагу процес відмирання стафілококів у біоплівці продовжувався, водночас вміст бактеріофагів перестав зростати і їх кількість становила  $2,4 \pm 0,2 \times 10^8$  БУО/см<sup>3</sup>. Упродовж наступних годин взаємодії бактеріофагів зі стафілококами у біоплівці продовжувалась літична дія бактеріофагів і через 32 години від початку контакту фагу з біоплівкою бактеріальні клітини не виділялися.

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

Час впливу бактеріофагу, год <sup>#</sup>	Кількість життєздатних клітин у біоплівці, КУО/см <sup>3</sup>	Титр бактеріофагів, БУО/см <sup>3</sup>
0 (початок досліду)	$9,3 \pm 0,9 \times 10^7$	$1,6 \pm 0,1 \times 10^6$
4	$9,4 \pm 0,9 \times 10^7$	$1,2 \pm 0,1 \times 10^8^*$
8	$5,2 \pm 0,5 \times 10^{6*}$	$1,1 \pm 0,2 \times 10^9^*$
12	$6,7 \pm 0,7 \times 10^{5*}$	$2,4 \pm 0,2 \times 10^8^*$
16	$4,4 \pm 0,4 \times 10^{3*}$	$3,7 \pm 0,4 \times 10^7^*$
20	$9,1 \pm 0,9 \times 10^{2*}$	$2,1 \pm 0,2 \times 10^7^*$
24	$2,2 \pm 0,2 \times 10^{2*}$	$1,8 \pm 0,2 \times 10^6$
28	$1,0 \pm 0,1 \times 10^{2*}$	$3,5 \pm 0,4 \times 10^3^*$
32	0	$10^{1*}$

Примітки: <sup>#</sup> – біоплівку вирощували протягом 72 годин, після чого вносили бактеріофаг; \* –  $p < 0,05$  порівняно з початковою кількістю

У підсумку отримані результати вказують на високу літичну активність бактеріофагу відносно зрілих біоплівкових бактерій та можливість його застосування при хронічних стафілококових інфекціях, спричинених *S. aureus var. bovis*.

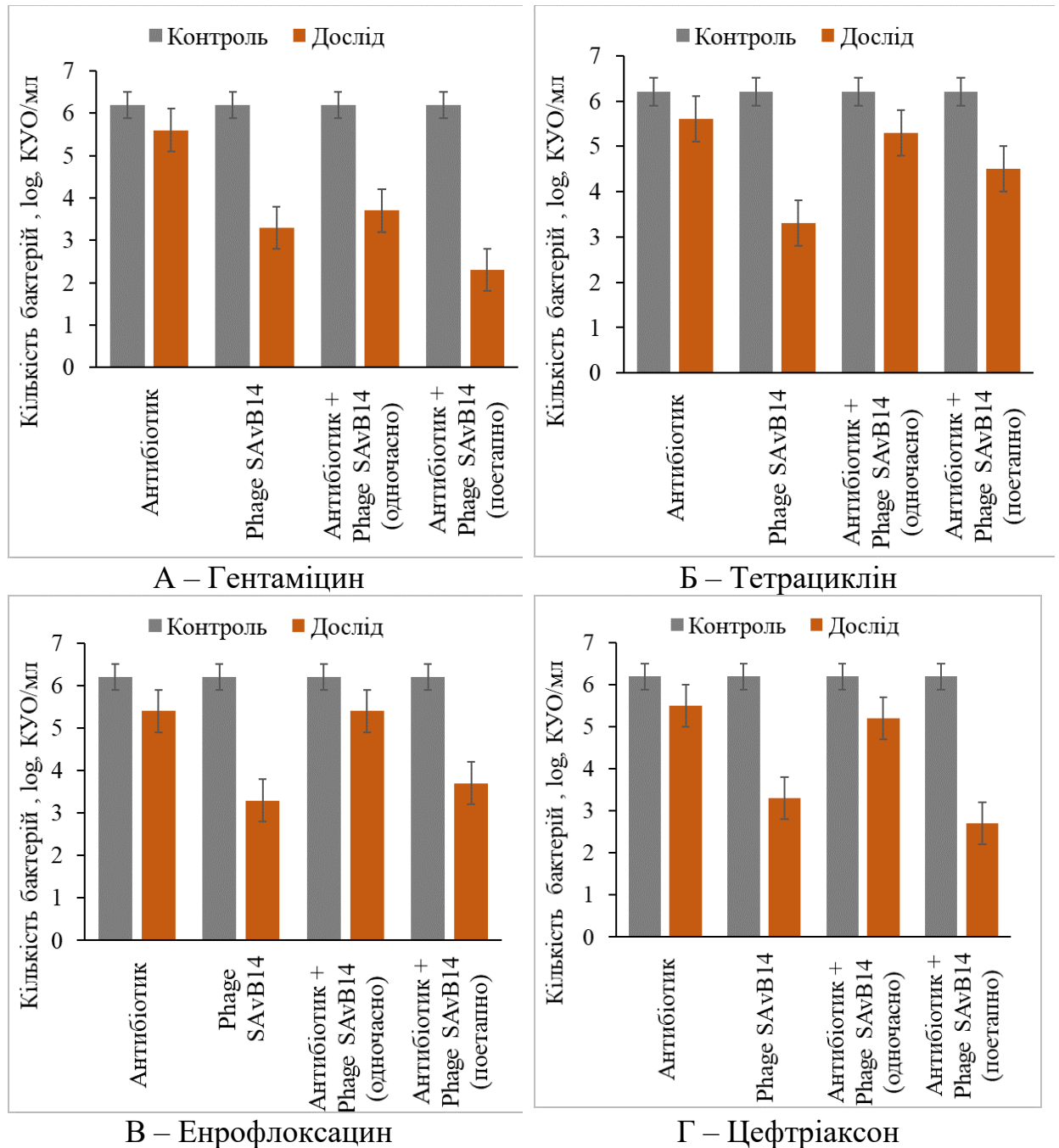
**Антимікробна дія бактеріофагу *Phage SA<sub>v</sub>B14* на біоплівки, сформовані *Staphylococcus aureus variant bovis* в комплексі з антибіотиками.** Для посилення ефекту фаготерапії було вивчено комбінований вплив на стафілококові біоплівки бактеріофагу в поєднанні з різними антибіотиками (рис. 6). Очікуваною перевагою такого підходу може бути сильніше пригнічення росту бактерій та знижена бактеріальна здатність до розвитку резистентності до фагів або антибіотиків.

Найчастіше для лікування корів за маститу використовують препарати на основі аміноглікозидів, тетрациклінів, цефалоспоринів та фторхінолонів. Для проведення досліду 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).

При визначенні кількості бактерій *S. aureus* у біоплівці за впливу на неї *Phage SA<sub>v</sub>B14* в комплексі з гентаміцином виявлено, що *Phage SA<sub>v</sub>B14* впливав на стафілококові біоплівки, так як кількість життєздатних клітин зменшилася в 7,94 раза ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з контрольною групою – дія на біоплівку ізотонічного розчину натрію хлориду. За цих же умов при дії на біоплівку тільки гентаміцину кількість стафілококів зменшилася у 3,98 раза ( $p < 0,05$ ), порівняно з контрольною групою. Однак, кращий антибіотико-плівковий ефект отримали після застосування фагу в комплексі з антибіотиком. При одночасному додаванні антибактеріальних речовин виявляли синергічну



взаємодію, яка проявлялася у зменшенні кількості бактерій у 39,81 раза ( $p < 0,05$ ), порівняно із застосуванням *Phage SA<sub>v</sub>B14* 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. 6. Вплив на біоплівки *S. aureus var. bovis* бактеріофагу *Phage SA<sub>v</sub>B14* в комплексі з антибіотиком, n = 3; контроль – дія на біоплівку стерильного ізотонічного розчину NaCl; дослід – дія на біоплівку антибіотику, антибіотику та бактеріофагу *Phage SA<sub>v</sub>B14* при одночасному внесенні, антибіотику та бактеріофагу *Phage SA<sub>v</sub>B14* за поетапного внесення**

Вплив на стафілококові біоплівки бактеріофагу *Phage SA $\nu$ B14* в комплексі з тетрацикліном виявив, що бактерицидна дія при взаємодії фагу з тетрацикліном була слабшою, порівняно 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, за поетапного внесення фагу та антибіотику виявляли вираженіший бактерицидний ефект – кількість бактерій була у 6,31 раза ( $p < 0,05$ ) меншою, ніж за одночасного застосування.

Препарат з групи фторхінолонів – енрофлоксацин також не посилював синергічну антимікробну дію при взаємодії з фагом *Phage SA $\nu$ B14* за одночасного застосування, кількість клітин у біоплівці була як за впливу фагу чи антибіотику. Проте, за поетапного застосування фагу і енрофлоксацину виявляли більшу загибель клітин стафілококів, їх кількість зменшилася в середньому в 50,12 раза ( $p < 0,05$ ) і становила 3,7 log КУО/см<sup>3</sup> змиву.

Подібну тенденцію відзначали і при дослідженні взаємодії *Phage SA $\nu$ B14* з цефтріаксоном. Встановлено, що тільки за поетапного застосування фагу і цефтріаксону спостерігали суттєве зменшення клітин стафілококів у біоплівці до 2,7 log КУО/см<sup>3</sup>, що в середньому 316,34 раза ( $p < 0,05$ ) менше, ніж за одночасного застосування фагу з антибіотиком. Інші варіанти знищення бактерій у біоплівці були менш ефективними.

Титр бактеріофагу *Phage SA $\nu$ B14* також зазнавав змін при застосуванні його з різними комбінаціями антибіотиків. Зокрема, при поетапному застосуванні бактеріофагів та антибіотиків, титр фагів був, в середньому, у 8,45 раза ( $p < 0,05$ ) вищим, ніж за одночасного застосування та становив 7,1 – 7,7 log БУО/см<sup>3</sup>. Одночасно, найнижчий титр встановили при одночасному застосуванні фагу з антибіотиком гентаміцином – log 5,4 БУО/см<sup>3</sup>. Важливо підкреслити, що за одночасного застосування фагу з іншими антибіотиками (тетрацикліном, енрофлоксацином та цефтріаксоном) він був вищим у 7,91 – 398, 10 раза ( $p < 0,05$ ), порівняно з гентаміцином.

Отже, результати досліджень вказують, що для знищення біоплівки *S. aureus var. bovis* можна використовувати *Phage SA $\nu$ B14* 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.

**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 інтрацистернального препарату було обрано штам *Phage SA $\nu$ B14*. Даний штам виділено зі зразка секрету молочної залози корови, хворої субклінічною формою маститу. Бактеріофаг *Phage SA $\nu$ B14* проявляв високу літичну активність щодо *Staphylococcus aureus var. bovis*. Штам бактеріофага *Phage SA $\nu$ B14* первинно задепонований у колекції мікроорганізмів Національного центру штамів мікроорганізмів України під номером 737 (Свідоцтво на штам від 05.03.2019) і на території України даного штаму досі не було ідентифіковано.

У результаті проведених досліджень отримано зразки бактеріофагового препарату, який назвали Фагомаст. Препарат у своєму складі містить вірулентні бактеріофаги *Phage SAvB14* з титром  $10^{-7}$  –  $10^{-9}$  БУО/см<sup>3</sup>, які проявляють літичну дію щодо *Staphylococcus aureus variant bovis*. Препарат фасували у шприци по 10 см<sup>3</sup> для індивідуального використання та зберігали в холодильнику.

При визначенні стабільності готового фагового препарату за методом «прискореного старіння» встановлено, що бактеріофаги у дослідних зразках препарату Фагомаст з різними титрами інактивуються в експериментальних умовах майже з однаковою швидкістю, за температури +40 °С їх активність знижується до  $10^4$  БУО/см<sup>3</sup>. За цих умов титр фагів залишався стабільним у контрольних зразках упродовж усього періоду випробування.

Паралельно також проведені дослідження з визначення активності (титру) бактеріофагів у препараті, величини рН середовища та стерильності протягом 12 місяців зберігання за температури від +2 до +6 °С (табл. 6). Встановлено, що на закінчення терміну зберігання не відбулося зниження титру бактеріофагів нижче  $10^7$  БУО/см<sup>3</sup>, величина рН середовища була в межах норми та майже не змінювалася до кінця експерименту. Протягом усього дослідного періоду препарат залишався стерильним.

Таблиця 6

#### Стабільність дослідних зразків препарату Фагомаст

Показник	Терміни зберігання, діб						
	30	60	120	180	240	300	360
Титр бактеріофагу*	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^6$
рН, од	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, отримані дані дають нам підстави вважати, що термін придатності препарату Фагомаст може становити до 394,8 діб за умови холодильного зберігання (+2 – +6 °С). Крім того, такий великий термін дозволяє не вносити консерванти у препарат.

**Токсикологічна оцінка препарату Фагомаст для лікування корів за маститу.** Під час дослідження гострої токсичності препарату Фагомаст (табл. 7), який вводили білим мишам у шлунок в дозах 2 000 та 5 000 мг/кг, не виявили клінічних ознак токсичності, усі тварини були живими. 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.

## Токсикологічні дослідження препарату Фагомаст

Вид дослідження	Вид тварин	Шлях введення, тривалість досліджень	Доза засобу	Результат досліджень
Гостра токсичність	Білі миші, n=18	одноразово, в/шлунково через зонд	2 000 мг/кг, концентрація фагових віріонів $1 \times 10^8$ БУО	ГОСТ 12.1.007-76 IV клас – малотоксичні $LD_{50}$ є більшою 5 000 мг/кг
			5 000 мг/кг, концентрація фагових віріонів $1 \times 10^8$ БУО	
Токсичність при багаторазовому введенні препарату	Білі миші, n=18	в/шлунково через зонд протягом 14 днів	2 000 мг/кг, концентрація фагових віріонів $1 \times 10^8$ БУО	ГОСТ 12.1.007-76 IV клас – малотоксичні $LD_{50}$ є більшою 5 000 мг/кг
			5 000 мг/кг, концентрація фагових віріонів $1 \times 10^8$ БУО	
Подразнююча дія	Кролики, n=6	Нанесення на слизову оболонку ока	0,1 см <sup>3</sup> , концентрація фагових віріонів $1 \times 10^8$ БУО	не спричиняє подразнюючу дію

За вивчення сенсibiliзувальної 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 сенсibiliзувальної дії.

Вивчення шкірно-резорбтивних властивостей препарату Фагомаст не виявило клінічних ознак токсичності, на що вказували результати досліджень – всі миші залишалися живими зі збереженням апетиту 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. Середня вага дослідних груп мишей, які отримували фаг та контрольної групи вірогідно не відрізнялася. За період дослідження тварини добре поїдали корм, не відзначалося ніяких фізіологічних відхилень. Під час патологоанатомічного розтину 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 шлунка та кишечника мишей, яким задавали Фагомаст, блідо-рожева, рельєфна, волога, блискуча, без нашарувань.

При багаторазовому введенні тваринам препарату Фагомаст протягом 14 діб змін з боку серцево-судинної, дихальної, травної, сечовидільної систем не встановлено. Препарат Фагомаст не впливав на стан еритропоезу, так як після введення 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.

Препарат Фагомаст не спричиняв будь-якого впливу на лейкопоез, про що вказують показники загальної кількості лейкоцитів у периферичній крові дослідних тварин на початку та впродовж усього періоду експерименту. Проведена диференціація лейкоцитів периферичної крові дослідних тварин, виражена у лейкограмі, показала, що тимчасові зміни морфологічного складу були відзначені через 3 год після обробки дослідним препаратом Фагомаст. Проте, уже через 7 діб після обробки кількість еозинофілів у периферичній крові дослідної групи мишей прийшла до норми та залишалася такою до кінця терміну досліджень. Крім того, через 3 год після введення білим мишам препарату Фагомаст був встановлений і лімфоцитоз, так як відносний вміст лімфоцитів вірогідно ( $p < 0,05$ ) зростав на 18 % проти власних початкових даних. Слід відзначити, 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 величин норми до кінця терміну експерименту. Всі інші морфологічні показники периферичної крові у дослідних мишей знаходилися в межах фізіологічної норми упродовж усього терміну експерименту.

Підсумовуючи вищевикладене робимо висновок, що таке введення дослідним тваринам препарату Фагомаст не впливає на загальний гемопоез, однак викликає незначну тимчасову еозинофілію та лімфоцитоз, які оптимізуються до норми за 7 діб після застосування препарату. Вважаємо, що це загальнопристосувальна реакція на дію препарату Фагомаст.

Отже, за результатами досліджень з'ясовано, що гостра токсичність препарату Фагомаст відповідає  $DL_{50}$  – більше 5000 мг/кг живої маси тварин. Препарат не володіє кумулятивними властивостями, не викликає подразнення, не володіє сенсibiliзувальними властивостями та нетоксичний за перорального введення в живий організм. При дослідженні крові

морфологічні показники вірогідно не змінювались. За встановленими клінічними ознаками робочі розчини препарату Фагомаст віднесено до IV класу (малотоксичні) щодо небезпечності.

**Вплив препарату Фагомаст на життєздатність інфузорій та слизову оболонку очей кроликів.** Встановлено, що за титру фагу в препараті від  $10^4$  до  $10^9$  БУО/см<sup>3</sup> не виявляли зміни рухової активності та патологоанатомічних відхилень у клітинах інфузорій. Тетрахімени були активними, їх рух характеризувався як прямолінійний та поступовий і не відрізнявся від руху інфузорій, наявних у контрольній пробі (пептонне середовище). За цих умов кількість мертвих клітин не відрізнялася у дослідних пробах від контрольних. 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. За цих умов встановлено зниження розмноження клітин *Tetrachymena pyriformis* у всіх пробах препарату з різною кількістю фагів та контрольної групи з вмістом допоміжних речовин, що входять у склад Фагомасту за 60 хв інкубації. Дане явище ми пояснюємо низькою поживною і біологічною цінністю препарату Фагомаст, адже при недостатній поживності середовища існування інфузорій, інтенсивність розмноження їх істотно знижується. Результати дослідження кількісного вмісту інфузорій у дослідних пробах та в контролі показали, 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 одногодинної експозиції тетрахімен у дослідних пробах їх кількість вірогідно не збільшилася у порівнянні з 30-хвилинною інкубацією і становила, в середньому  $31,1 \pm 1,3$  шт. У контрольному пептонному середовищі виявляли збільшення кількості інфузорій приблизно на 21,7 % ( $p < 0,05$ ) проти дослідних зразків із вмістом фагів від  $10^4$  до  $10^9$  БУО/см<sup>3</sup>. Даний процес, як було сказано вище, відбувається за рахунок відсутності поживних речовин у препараті Фагомаст.

Отже, підсумовуючи результати даного дослідження необхідно зазначити, що розроблений фаговий препарат Фагомаст для лікування корів за маститу не спричиняє токсичного впливу на життєдіяльність культур інфузорій *Tetrachymena pyriformis* за умови наявності у його складі фагових частин до  $10^9$  БУО/см<sup>3</sup>.

Місцеву подразнювальну (шкідливу) дію препарату за різних концентрацій фагових частин досліджували на слизових оболонках очей кроликів. Встановлено, що протягом тривалості експерименту видимих змін стану слизових оболонок не спостерігали, як за внесення препарату за кількості фагових частин  $10^4$  БУО/см<sup>3</sup>, так і за максимального вмісту  $10^9$  БУО/см<sup>3</sup>. Усі кролики після закапування Фагомасту в око відразу відкривали око та в подальшому були рухливі без зміни поведінки.

Отже, на підставі проведеного експерименту вважаємо, що фаговий препарат Фагомаст для лікування корів за маститу не спричиняв місцевої подразнювальної дії на слизову оболонку очей кролика за кількості фагових частинок від  $10^4$  до  $10^9$  БУО/см<sup>3</sup>.

**Фармакологічна ефективність застосування препарату Фагомаст залежно від вмісту діючої речовини.** Для визначення оптимальної терапевтичної дози препарату Фагомаст розроблено дослідні зразки з різними титрами бактеріофагу *Phage SAvB14*:  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  та  $10^{-9}$  БУО/см<sup>3</sup>. Встановлено, що добру терапевтичну ефективність проявляли всі партії Фагомасту (81,8 – 92,8%), проте тривалість лікування тварин була різною (табл. 8).

Таблиця 8

**Ефективність лікування корів за субклінічного стафілококового маститу препаратом Фагомаст з різними титрами фагу**

Групи тварин	Титр <i>Phage SAvB14</i> у дослідному зразку препарату, БУО/см <sup>3</sup>	Піддано лікуванню		Результати лікування, одужало:	Тривалість лікування, діб	
		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: \* –  $p < 0,05$  порівняно з коровами контрольної групи

Зокрема, при застосуванні препарату Фагомаст із титром фагів  $10^{-9}$  БУО/см<sup>3</sup> тварини одужали майже одночасно з коровами, яким для лікування використовували антибіотики. За цих умов тривалість лікування була коротшою на одну добу ( $p < 0,05$ ), ніж у корів другої групи, яким вводили титр фагів  $10^{-8}$  БУО/см<sup>3</sup> та на 1,5 днів ( $p < 0,05$ ) порівняно з коровами першої групи, яким вводили титр фагів  $10^{-7}$  БУО/см<sup>3</sup>.

Отримані дані підтверджені в лабораторних умовах. Так, після застосування препарату з титром бактеріофагів  $10^{-8}$  та  $10^{-9}$  БУО/см<sup>3</sup> через 48 годин реакція з мастидином була оцінена як сумнівна, а через 72 години – як негативна. Такі ж результати отримали при лікуванні препаратом з антибіотиком. За цих умов у корів першої групи (титр фагів у препараті  $10^{-7}$  БУО/см<sup>3</sup>) спостерігали позитивні результати через 72 та 96 годин відповідно.

Результати дослідження вмісту золотистого стафілококу та титру *Phage SAvB14* у секреті показали, що вміст золотистого стафілококу у молоці корів через 12 годин після введення препарату з титром фагів  $10^{-9}$  БУО/см<sup>3</sup> знизився у 6 разів ( $p < 0,05$ ), а через 48 годин – у 40 ( $p < 0,05$ ), і після 60 годин терапії взагалі не виділявся. За цих умов титр бактеріофагів залишався на рівні

$10^{-7}$  БУО/см<sup>3</sup>, і коли кількість чутливих бактерій знизилася до нуля – скоротився на 2 порядки. В той же час, при титрі  $10^{-7}$  та  $10^{-8}$  БУО/см<sup>3</sup> зменшення золотистого стафілококу відбувалося повільніше, через 12 годин після застосування дослідних зразків першій та 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 другої групи – через 84 години, що у 1,6 та 1,4 раза пізніше, ніж у третій групі. Титр бактеріофагів у секреті корів першої та другої груп у першу добу лікування був дещо нижчим, ніж у третій:  $10^{-5}$  та  $10^{-6}$  БУО/см<sup>3</sup> та продовжував поступово знижуватися при зменшенні кількості цільових бактерій.

Отже, проведені дослідження вказують, 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*.

**Фармакотерапевтична ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст за субклінічного маститу у корів.** Терапевтична ефективність застосування препарату Фагомаст за субклінічного маститу корів у порівнянні з іншими протимаститними препаратами з вмістом антибіотиків виявила, що кількість здорових чверток вимені після лікування становила 92,1 %. Під час лікування кількість соматичних клітин у молоці зменшилася, в середньому, у 16,8 раза ( $p < 0,05$ ) і становила  $250,1 \pm 22,3$  тис./см<sup>3</sup>, що відповідає значенням для здорових тварин (табл. 9). За цих умов золотистий стафілокок не виділяли з молока після завершення лікування. Схожі результати отримані при визначенні терапевтичної ефективності препаратами на основі антибіотиків, проте незначне виділення *S. aureus* ( $50,5 \pm 4,0 - 80,3 \pm 6,2$  КУО/см<sup>3</sup>) встановлено при лікуванні препаратами Мастіет Форте та Біофлок LC, що може вказувати про його наявність на шкірі діжок вимені.

Таблиця 9

**Фармакологічна ефективність препарату Фагомаст у корів за субклінічного маститу,  $\bar{x} \pm SE$**

Групи тварин	Препарат, який застосовували	Показники секрету вимені			
		кількість <i>S. aureus</i> , КУО/см <sup>3</sup>		кількість соматичних клітин, тис./см <sup>3</sup>	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
Контроль, n=47	Пенікан П	2900±261	0	3800±304	260,4±20,7
	Мастіет 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



Отже, проведені дослідження підтверджують високу терапевтичну ефективність розробленого препарату Фагомаст для лікування маститу у корів, що дозволить підвищити екологічність отриманої продукції та мінімізувати обмежувальні заходи щодо випуску продукції при використанні антибактеріальних засобів.

**Динаміка морфологічних та біохімічних показників крові корів, хворих маститом, при застосуванні препарату Фагомаст.** Під час введення препарату Фагомаст здоровим тваринам не спостерігали видимих клінічних ознак таких як: набряку, гіперемії, підвищення загальної та місцевої температури, зміни кількості соматичних клітин у молоці. До того ж, не встановлено значних змін показників крові тварин. За цих умов динаміка змін морфологічних і біохімічних показників крові у тварин, яким застосовували бактеріофаг, була практично аналогічна як у корів, яких лікували антибіотиками. Відновлення показників крові до фізіологічних значень відбувалося упродовж 5 діб.

**Вплив препарату Фагомаст на показники природної резистентності корів, хворих на мастит.** 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.

**Фармакотерапевтична ефективність бактеріофагового препарату Фагомаст за клінічного маститу у корів.** Встановлено, що ефективність лікування корів за 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 відзначали, реакція з мастидином була негативна, збудник з молочної залози не виділявся, а кількість соматичних клітин не перевищувала 300 тис./см<sup>3</sup>. За лікування внутрішньоцистернальними препаратами Пенікан П та Біофлок LC виявляли ефективність лікування на рівні 66,7 %.

У дослідній групі, де застосовували Фагомаст, 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./см<sup>3</sup>, що вказує на завершення запального процесу.

У середньому курс лікування препаратами на основі антибіотиків становив 5 – 6 діб, а фаговим препаратом – 5 діб, це вказує на те, що вірогідної різниці немає. Проте, встановлено, що період часу вибраковування 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 препаратом Фагомаст 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 вибракування молока, що позитивно впливає на ефективність лікування в цілому.

Отже, 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 вибракування молока за рахунок відсутності у ньому залишкових кількостей антибіотиків.

Препарат Фагомаст проявляє високу літичну активність на планктонні та біоплівкові форми *S. aureus* – збудника маститу корів, стійкий до чинників навколишнього середовища, нетоксичний для організму лабораторних тварин, екологічно безпечний та забезпечує значну ефективність під час лікування маститу.

## 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 внутрішньоцистернальний препарат Фагомаст, діючою складовою якого є фаг *Phage SAvB14* з титром не менше  $10^{-7}$  БУО/см<sup>3</sup>, 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 DL<sub>50</sub> Фагомасту становить більше 5000 мг/кг живої маси тварин. Препарат не володіє кумулятивними, сенсibiliзуючими 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 фагів від  $10^4$  до  $10^9$  БУО/см<sup>3</sup> 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 інтрацистернально коровам за субклінічного маститу Фагомасту з вмістом  $10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}$  БУО/см<sup>3</sup> два рази на добу, титр бактеріофагів залишається на рівні  $10^{-6}$  БУО/ см<sup>3</sup> 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 SA<sub>v</sub>B14* з антибіотиками спостерігається за їх поетапного застосування (спочатку бактеріофаг, потім антибіотик). За одночасного застосування *Phage SA<sub>v</sub>B14* 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 SA<sub>v</sub>B14* та тетрацикліну не виявляється синергічного ефекту, водночас при поетапному внесенні *Phage SA<sub>v</sub>B14* 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 SA<sub>v</sub>B14* 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./см<sup>3</sup>. 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  $5,3 \lg \text{ КУО/см}^2$  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 SAvB07*, *Phage SAvB08*, *Phage SAvB12*, *Phage SAvB14*. До того ж, серед досліджених штамів *Phage SAvB14* має короткий латентний період (до 35 хвилин), 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/см<sup>3</sup> на *S. aureus var. bovis* з вмістом  $10^5$  КУО/см<sup>3</sup>, кількість бактерій зменшилася у 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), порівняно з дією фагу  $10^{-6}$  БУО/см<sup>3</sup>. Упродовж 24 год контакту фагу з клітинами *S. aureus var. bovis* у суспензії кількість бактерій зменшилася до  $7,8 \pm 0,3 \times 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>. 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/см<sup>3</sup>.

12. Встановлено, що для ефективного використання фагів потрібно враховувати біологічне походження штамів стафілококів. Так, *Phage SAvB14* лізує  $92,7 \pm 8,3\%$  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  $48,7 \pm 4,3\%$  до  $62,1 \pm 4,8\%$  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 SAвB14* 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  $1,5 \pm 0,3 \times 10^6$  до  $1,3 \pm 0,2 \times 10^3$  КУО/см<sup>3</sup> 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 раза ( $p < 0,05$ ) 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 раза ( $p < 0,05$ ) 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 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 SA<sub>v</sub>B14*, 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 SA<sub>v</sub>B14*, 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/vtpp.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/vtpp.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., Stravsky Y.S., Havrylianchuk 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., Stravsky 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. *Veterinární Medicina*. 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](http://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). № и 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 f для ветеринарної мікробіології: пат. 137461 Україна: МПК (1901.01) C12N 1/00. № и 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 маститу 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 SA<sub>v</sub>B14. *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 SA<sub>v</sub>B14 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 SA<sub>v</sub>B14 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<sub>v</sub>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.

## 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. – Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Львів, 2023.

Розроблено внутрішньоцистернальний препарат Фагомаст для профілактики та лікування корів за маститу, як альтернативу антибіотикам при одержанні екологічно безпечного молока. Вивчено його токсико-фармакологічні властивості, вплив на організм дослідних лабораторних тварин та терапевтичну ефективність під час лікування корів за різних форм маститу. Фармакологічна ефективність від застосування Фагомасту при лікуванні корів за субклінічного маститу становила 92,1 %, водночас *S. aureus* через 5 діб після завершення лікування не виділявся, а кількість соматичних клітин знижувалася у 16,8 раз до  $250,1 \pm 22,3$  тис./см<sup>3</sup>. Фармакологічна ефективність лікування корів за клінічної форми маститу становила 71,4 %. Проведені дослідження підтверджують високу фармако-терапевтичну ефективність розробленого препарату Фагомаст для лікування корів за стафілококового маститу та дозволять підвищити екологічність отриманої продукції і мінімізувати обмежувальні заходи щодо випуску продукції при використанні антибактеріальних препаратів.

Встановлено, що серед збудників, як гострої, так і хронічної форм маститу найбільшою плівко- та токсиноутворювальною здатністю володіють штами *S. aureus*, крім того, вони являють собою великий резервуар генів резистентності до антимікробних препаратів, в 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.

Виділено та досліджено біологічні властивості високолітичного штаму бактеріофагу *Phage SA $\nu$ B14*. Встановлено, що він 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 з

формуванням високого титру нових віріонів. *Phage SA $\nu$ B14* ефективно проникає у матрикс біоплівки та знищує плівкоутворюючі збудники маститу *S. aureus var. bovis* та може бути використаний у комплексі з антибіотиками.

**Ключові слова:** бактеріофаговий препарат Фагомаст, антибіотики і антибактеріальні протимаститні препарати, фармако-токсикологічна оцінка Фагомасту, літична активність фагів, *Phage* фаг *SA $\nu$ B14*, *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. – Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Lviv, 2023.

An intracisternal drug Fagomast has been developed for the prevention and treatment of cows with mastitis, as an alternative to antibiotics for obtaining environmentally safe milk. Its toxico-pharmacological properties, effects on the organism of experimental laboratory animals and therapeutic effectiveness during the treatment of cows with various forms of mastitis have been studied. The pharmacological 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 the treatment, and the number of somatic cells decreased by 16.8 times to  $250.1 \pm 22.3$  ths/cm<sup>3</sup>. Pharmacological efficiency of treatment of cows with clinical form of mastitis was 71.4 %. The conducted studies confirm the high pharmacotherapeutic effectiveness of the developed drug Fagomast for the treatment of cows with staphylococcal mastitis and will allow to increase the environmental friendliness of the obtained products and minimize restrictive measures regarding the production of dugs when using antibacterial drugs.

It has been established that among the causative agents of both acute and chronic forms of mastitis, *S. aureus* strains have the greatest film- and toxin-forming ability, in addition, they represent a large reservoir of genes for resistance to antimicrobial drugs, including resistance to methicillin, which in the process of production of milk can contaminate it and be transmitted to humans. It has been found that drugs based on industrially produced bacteriophages are ineffective against cultures of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products and from cows suffering from mastitis.

The biological properties of the highly lytic bacteriophage strain *Phage SA $\nu$ B14* have been isolated and studied. It has been established that it exhibits high lytic 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 SA $\nu$ B14* effectively penetrates the

biofilm matrix and destroys the film-forming pathogens of mastitis *S. aureus var. bovis* and can be used in combination with antibiotics.

**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.