

СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ТИТУХ ЯРОСЛАВ ВІКТОРОВИЧ

УДК: 619:618.19-002-08.636.18

ДИСЕРТАЦІЯ

**КЛІНІКО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ
ЛІКУВАННЯ КОРІВ ЗА СУБКЛІНІЧНОГО МАСТИТУ**

21 – Ветеринарна медицина

211 – Ветеринарна медичина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 **Я.В. Титух**

Науковий керівник: **Мусієнко Юрій Володимирович** кандидат
ветеринарних наук, доцент

Суми – 2022

АНОТАЦІЯ

Титух Я.В. Клініко-експериментальне обґрунтування лікування корів за субклінічного маститу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 Ветеринарна медицина – Сумський національний аграрний університет, МОН України, Суми, 2022.

У дисертаційному дослідженні розроблена та запропонована схема застосування альтернативного методу лікування субклінічного маститу у корів на основі пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* NCH 55 з використанням комплексного підходу. Вперше експериментально доведена терапевтична ефективність застосування пробіотику при субклінічному маститі, встановлений позитивний вплив на мікробіота шлунково-кишкового тракту та відновлення молочної продуктивності; визначено етіологію виникнення субклінічного маститу в корів у господарствах, встановлено основних збудників маститу; досліджені властивості штаму *Bacillus megaterium* NCH 55 для можливості його застосування для тварин.

За результатами проведених досліджень встановлено, що штам *Bacillus megaterium* NCH 55 є авірулентним непатогенним мікроорганізмом, що належить до I групи ризику: «відсутній або дуже низький індивідуальний і суспільний ризик» $LD_{50\text{ пер ос}} > 8 \times 10^9$, $LD_{50} > 1 \times 10^9$. Мікроорганізми цієї групи ризику дозволені МОЗ України до використання у виробництві. Дослідження проведені для депонування культури як первинна санітарно-гігієнічна оцінка штаму.

Протимікробну активність *Bacillus megaterium* NCH 55 визначали за класичним методом відтермінованого антагонізму. Встановлено, що тестові штами мікроорганізмів *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* K12 NCTC 10538, *S. typhimurium* ATCC 29630, *Candida albicans* ATCC були чутливі до *B. megaterium* NCH 55.

У роботі також визначали антагоністичні властивості пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* стосовно мікроорганізмів-ізолятів, отриманих у молочних господарствах від корів, хворих на субклінічний мастит. Встановлено, що у розведенні 1×10^9 , КУО/г *B. megaterium* NCH 55 проявляв максимальні антагоністичні властивості у вигляді зони затримки росту відносно всіх виділених ізолятів збудників маститу: *S. agalactiae* – на 12,2 %; *S. aureus* – на 10,5 %; *S. epidermidis* – на 16,3 %; *E. fecalis* – на 19,6 %; *E. coli* – на 8,9 %; *Candida* – на 22,62 %.

Мікроскопічними дослідженнями встановлено, що бактерії *B. megaterium* NCH 55 мають вигляд гладких, дещо зігнутих грам позитивних паличок, які здатні утворювати ендоспори; використовують лактозу та глюкозу як джерела вуглецю; не ферментують індол, рамнозу, арабінозу, сорбіт, але здатні утворювати сечовину, виробляють ферменти мальтазу, целюлазу, амілазу. Індекс адгезійності еритроцитів (ІАЕ) складав $2,0 \pm 0,11$, що відповідно до класифікації Бріліс вважається показником низької адгезії. Середній показник адгезії (СПА) складав $1,70 \pm 0,09$ при коефіцієнті участі еритроцитів в адгезійному процесі (КУЕ) – $84,25 \pm 2,53$. Для дослідження чистоти культури *B. megaterium* NCH 55 визначали її антибіотикорезистентність. У результаті проведених досліджень встановлено, що культура *B. megaterium* NCH 55 має високу чутливість до препаратів: хлорамфеніколу, фраміцетину, стрептоміцину, лінкоміцину, окситетрацикліну, канаміцину, рифампіцину, та ванкоміцину; низьку чутливість – до оксациліну, поліміксину, пеніциліну, бацитрацину, гентаміцину, ампіциліну; не чутлива – до метіциліну та бензилпеніциліну.

В умовах виробництва встановлено, що у тваринницькому приміщенні взимку відносна вологість перевищує максимально допустиму межу на 16,36 %. На фоні збільшення вологості в приміщенні також показник мікробної забрудненості перевищував допустимі межі восени – на 8,69 %, взимку – на 25,21 % та влітку на 14,61 %.

Недотримання санітарних норм сприяє виникненню маститу. Для

визначення зазначених ризиків у подальших дослідженнях проводили моніторинг збудників маститу.

Експериментально встановлено, що основними збудниками субклінічного маститу у дослідних господарствах були *S. agalactiae* (20 %), *S. aureus* (17 %), *S. epidermidis* (15 %), *E. fecalis* (12 %), *E. coli* (10 %), *Mycoplasma spp.* (8 %), гриби *Candida* (7 %) та асоційована мікрофлора (11 %).

Доведено, що в першу лактацію у молоці корів спостерігали збільшення кількості соматичних клітин (КСК) на сьому добу захворювання порівняно до початку хвороби на 87,4 %; на десяту – 143,0%; на п'ятнадцяту – 17,0 % відповідно. У корів другої лактації також прослідковується тенденція збільшення запалення вим'я на сьому добу – 78,2 %; на десяту – 142 %; на п'ятнадцяту – 8,0 % відповідно. Дослідженнями було встановлено, що КСК позитивно корелюється із патогенністю збудника маститу та кМАФАНМ.

Захворюваність на мастит у корів тісно пов'язана з шлунково-кишковим трактом, тому в роботі визначали вплив *Bacillus megaterium* на систему травлення. В дозі 15,0 г на тварину *B. megaterium* (1×10^9 КУО/г) сприяв збільшенню кількості *Lactobacillus spp.* на 10,0 % та *Bifidobacterium* на 12,0 % порівняно до контролю. Відбувалось незначне пригнічення умовно-патогенної мікрофлори. Збільшення дози *B. megaterium* (1×10^9 КУО/г) до 25,0 г на тварину мало позитивний вплив на мікробіоту шлунково-кишкового тракту. При цьому рівень корисної мікрофлори збільшувався за рахунок *Lactobacillus spp.* на 35,0 % та *Bifidobacterium* на 30,0 % порівняно до контролю.

За результатами проведеного дослідження можна сказати, що максимальний позитивний виражений ефект на мікрофлору шлунково-кишкового тракту корів мало використання *Bacillus megaterium* (1×10^9 КУО/г) в дозі 35 г на тварину. При цьому кількість *Lactobacillus spp.* була більше на 67 % та *Bifidobacterium* на 58 % порівняно до контролю. Крім того зменшився рівень умовно-патогенної мікрофлори: *Escherichia coli* – на 45,0 %, *Staphylococcus aureus* – на 35,0 %, *Streptococcus agalactiae* – на 20,0 %, *Streptococcus epidermidis* – на 15,0 %, *Enterococcus faecalis* – на 12,0 %, *Enterobacteriaceae* – на 10,0 %, *Mycoplasma spp.* – на 8,0 %, *Candida* – на 7,0 % порівняно до контролю.

Clostridium spp – 27,0 %, *Enterobacteriaceae* та *Staphylococcus spp.* – 75,0 %, *Candida* – 80,0%, порівняно до контролю.

Для встановлення впливу на організм тварин дослідного пробіотику в роботі визначали вплив пробіотику на метаболізм корів за субклінічного маститу. За результатами проведених досліджень встановлено, що рівень метаболітів у крові хворих корів по закінченню періоду лікування був менше за рахунок АСТ на 53,69 % та АЛТ на 51,33 %. Результати підтверджують відсутність токсичного впливу використаного пробіотику для лікування маститу у корів. Крім того, доводять, що використання *B. megaterium* (1×10^9 КУО/г) в дозі 35,0 г на тварину має лікувальний ефект на організм в цілому та зменшення запальних процесів у вимені корів. Підтвердженням цих результатів є показник кількості соматичних клітин (КСК), який по завершенню дослідження зменшується у 70 разів, порівняно до початку експерименту у хворих на субклінічний мастит корів, що відповідає гатунку «Екстра».

Був проведений дослід у виробничих умовах по визначенню впливу *B. megaterium* NCH 55 на молочну продуктивність корів. Коровам, хворим на субклінічний мастит, разом з концентрованими кормами задавали спори *B. megaterium* NCH 55 (1×10^9 КУО/г) в дозі 35,0 г на тварину протягом 30 діб. Під час проведення експерименту визначали якість отриманого молока та молочну продуктивність дослідних тварин.

У корови UA8014876120 у червні місяці лактація була 14 кг/добу, кМАФАНМ 560×10^3 КУО/см³ та КСК 800×10^3 КУО/см³, що вказує на запалення вимені. У червні проводили лікування пробіотиком, при цьому продуктивність збільшилась на 85,7 %; зменшились кМАФАНМ – на 44,64 % та КСК – на 51,87 %. В серпні продуктивність корови збільшилась до 34 кг/добу, при цьому якісні показники молока відповідали гатунку «Екстра».

У тварини UA8010629706 на початку дослідження продуктивність складала 37 кг/добу, однак з березня по червень ці показники коливались від 21 до 28 кг/добу, що було пов'язано із зміною кормів і збільшенням

кМАФАНМ на 250 % та КСК – на 152,94 %. Термін лікування у липні склав 30 діб. По завершенню експерименту в серпні молочна продуктивність сягала вже 35 кг/добу, якість молока відповідала гатунку «Екстра».

Корова UA8013283674 мала високу продуктивність з лютого по травень на рівні 35-37 кг/добу, однак при цьому погіршувалась якість молока. У червні місяці збільшились показники кМАФАНМ на 428,57 % та КСК – на 515 %, що вказує на розвиток субклінічного маститу. Після лікування на основі *Bacillus megaterium* продуктивність повернулась до початкових показників, якість молока відповідала ДСТУ 3662:2018.

З лютого по червень продуктивність корови UA8013420982 була на рівні 14-15 кг/добу з поступовим погіршенням якості молока. Терапія пробіотиком у липні дозволила збільшити продуктивність на 86,6%; зменшився вміст кМАФАНМ на 61,19 % та КСК – на 125 %, порівняно до початку дослідження. Подібна картина розвитку субклінічного маститу спостерігалась у тварини UA6100439832. В результаті лікування на серпень показники продуктивності практично не відрізнялись від початкових; знизився рівень кМАФАНМ на 140 % та КСК – на 342,30 %. При цьому встановлено, що якість молока відповідала гатунку «Перший».

У корови UA8013283631 протягом березня та липня продуктивність коливалась на межі 20-25 кг/добу. Якість молока погіршилась у червні, після чого тварина отримала лікування пробіотиком. На момент завершення експерименту продуктивність збільшилась на 31,81 %, знизились кМАФАНМ – на 62,84 % та КСК – на 42,50 %, що відповідає гатунку «Вищій».

У тварини UA8012102570 виявлена низька продуктивність та якість молока. Тому у липні корові застосовували схему лікування на основі *Bacillus megaterium*. По завершенню експерименту в серпні продуктивність корови збільшилась на 75 %; зменшились кМАФАНМ – на 81,42 % та КСК – на 45,34 %, молоко згідно ДСТУ 3662:2018 відповідало гатунку «Екстра».

У травні та червні у корови UA8013283670 зменшилась молочковіддача та погіршилась якість молока. По завершенню експерименту в серпні

продуктивність збільшилась на 28 %, зменшилися кМАФАнМ – на 29 % та КСК – на 47,61 %. У корови UA8014655883 в червні продуктивність була високою, але погіршилась якість молока. Продуктивність тварини виросла по закінченню експерименту на 18,75 %; при цьому кМАФАнМ зменшився на – 233,33 %; та КСК – на 124,35 %.

З травня по червень у тварини UA8014703811 поступово зменшувалась молочна продуктивність, також збільшувалась кількість мікроорганізмів та соматичних клітин у молоці. Після лікування у корови зросла продуктивність на 20 %; зменшилися кМАФАнМ – на 68,95 % та КСК – на 77,5 %.

У ході проведення дослідження були помічені покращення загального стану тварин. У корів підвищився апетит та поступово збільшилась молоковіддача. Також по завершенню експерименту молочна продуктивність становила у 40 % корів – 34-35 кг/добу; у 30% – 30-32 кг/добу та 30 % – 25-29 кг/добу.

У 70 % корів, які на 30 добу дослідження досягли продуктивності більше 30 кг/добу, показники молока такі як кількість соматичних клітин ($КСК \leq 400$ тис/см³) та кМАФАнМ (≤ 100 тис.КУО/см³) відповідали класу «Екстра».

Коровам, які не досягли продуктивності 30 кг/добу продовжили лікування в індивідуальному порядку. При цьому у молоці корів кількість соматичних клітин була ≤ 500 тис/см³ та кМАФАнМ ≤ 200 тис.КУО/см³. Таке молоко придатне до споживання, але відповідає технічним умовам гатунку «Вищий» або «Перший» і реалізується за нижчою вартістю. Вважаємо, що термін одужання тварин хворих на субклінічний мастит залежав від ступеня ураження молочної залози та індивідуальних особливостей організму. Дію пробіотичного препарату в організмі тварин прослідкувати достатньо складно, оскільки цей вплив багатовекторний.

Дослідженнями встановлено, що пробіотики не обов'язково спрямовані тільки на відновлення мікробної спільноти, оскільки, наприклад, деякі види пробіотиків підвищують стійкість організму тварин до колонізації

патогенами, а також на їхнє знищення. *Bacillus megaterium* найбільший за розміром із родини *Bacillus*. *Bacillus megaterium*, розмножуючись, створює специфічне середовище, покращує мікрофлору рубця. Крім того, *Bacillus megaterium* знищує патогенні мікроорганізми за рахунок продукції високоспецифічного протимікробного білку – мегацину.

За результатами проведеного дослідження встановлено, що *S. aureus* був виділений у 22 % дослідних зразків молока корів хворих на субклінічний мастит. Соматичні клітини молока здорової корови представлені в основному епітеліальними клітинами, поодинокими сегментоядерними нейтрофілами, моноцитами та базофілами. У молоці хворих на субклінічний мастит корів спостерігається збільшення в десятки разів епітеліальних клітин, лімфоцитів, базофілів; нейтрофілів та моноцитів.

Дослідженнями встановлено, що в процесі розвитку запалення вимені у молоці корів одночасно збільшується кількість соматичних клітин та мікроорганізмів і зменшується молоковіддача. Також продуктивність дослідних тварин зменшується у перехідний зимово-весняний період через зміну корму та кліматичних умов. Лікування хворих на субклінічний мастит корів пробіотичним штамом *B. megaterium* NCH 55 дало можливість збільшити продуктивність у 70,0 % тварин та поліпшити якість молока до гатунку «Екстра».

За результатами проведених досліджень була запропонована схема застосування *B. megaterium* NCH 55 для молочних корів для лікування та профілактики субклінічного маститу з використанням комплексного підходу.

Дослідженнями доведено, що застосування *Bacillus megaterium* у дозі 15 г тваринам протягом 30 діб сприяло зменшенню мікрофлори в молоці на 18 % та кількості соматичних клітин на – 33,5 %, порівняно до початку лікування. Збільшенням дози *Bacillus megaterium* до 25 г корові відбувалось зменшення кМАФАНМ на 21,2 % та КСК на – 58,2 %, порівняно до початку дослідження. Повернення показників молока до класу екстра відбувалось при задаванні тваринам *Bacillus megaterium* у дозі 35 г протягом місяця. При

цьому кількість мікрофлори у молоці зменшилась на 40,2 %, а кількість соматичних клітин на 87,9 %. Важливим результатом є ефективне лікування корів від субклінічного маститу без застосування антимікробних засобів, а також покращенням мікробіому.

За результатами проведених досліджень розроблена схема застосування *Bacillus megaterium* NCH 55. Доведено, що згодовування *B. megaterium* у дозі 15 г тваринам призводило до зниження кМАФАНМ в молоці на 18,0 % та КСК – 33,5 %; у дозі 25 г кМАФАНМ на 21,2 % та КСК – 58,2 %, у дозі 35 г кМАФАНМ на 40,2 % та КСК – 87,9 %, молоко відповідало гатунку «Екстра».

Ключові слова: корови, мастит, соматичні клітини, пробіотик, мікробний антагонізм, мікроорганізми, якість молока, молочна продуктивність.

ABSTRACT

Tytukh Ya.V. Clinical-experimental justification for treatment of cows with subclinical mastitis. – Qualifying scientific work on manuscript rights. Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 211 Veterinary medicine – Sumy National Agrarian University, MES of Ukraine, Sumy, 2022.

The dissertation study developed and proposed a scheme for the use of an alternative method of treating subclinical mastitis in cows based on the probiotic strain *Bacillus megaterium* NCH 55 using an integrated approach. For the first time, the therapeutic effectiveness of the probiotic usage in subclinical mastitis was experimentally proven, a positive effect on the microbiota of the gastrointestinal tract and the retrieval of milk productivity were established; the etiology of subclinical mastitis in cows on farms was determined, the main causative agents of mastitis were established; properties of the *Bacillus megaterium* NCH 55 strain for the possibility of its using for animals were investigated.

Based on the research results, it was established that the *Bacillus megaterium* NCH 55 strain is an avirulent non-pathogenic microorganism belonging to the I risk group "no or low individual and community risk" $LD_{50} \text{ per os} > 8 \times 10^9$, $LD_{50} > 1 \times 10^9$. Microorganisms of this risk group are approved by the Ministry of Health of Ukraine for use in production. The studies were carried out for depositing the culture as a primary sanitary-hygienic assessment of the strain.

The antimicrobial activity of *Bacillus megaterium* NCH 55 was determined by the classical method of delayed antagonism. It was established that the test strains of microorganisms *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* K12 NCTC 10538, *S. typhimurium* ATCC 29630, *Candida albicans* ATCC were sensitive to *B. megaterium* NCH 55. The work also determined the antagonistic properties of the probiotic strain *Bacillus megaterium* in relation to microorganisms-isolates obtained in dairy farms from cows suffering from subclinical mastitis. It was established that in a dilution of 1×10^9 , CFU/g, *B.*

megaterium NCH 55 showed maximum antagonistic properties in the form of a growth inhibition zone all selected isolates of mastitis pathogens: *S. agalactiae* – by 12.2 %; *S. aureus* – by 10.5 %; *S. epidermidis* – by 16.3 %; *E. fecalis* – by 19.6 %; *E. coli* – by 8.9 %; *Candida* – by 22.62 %.

Microscopic studies have shown that *B. megaterium* NCH 55 bacteria have the appearance of smooth, slightly bent gram-positive rods that are capable of forming endospores; use lactose and glucose as carbon sources; do not ferment indole, rhamnose, arabinose, sorbitol, but are able to form urea, produce maltase, cellulase, amylase, enzymes. The index of erythrocytes adhesion (IEA) was 2.0 ± 0.11 , which, according to the Brilis classification, is considered an indicator of low adhesion. The average adhesion index (AAI) was 1.70 ± 0.09 , while the coefficient of erythrocytes participation in the adhesion process (CEP) was 84.25 ± 2.53 . To study the purity of the *B. megaterium* NCH 55 culture, its antibiotic resistance was determined. As a result of the conducted studies, it was established that the culture of *B. megaterium* NCH 55 has a high sensitivity to the following drugs: chloramphenicol, framycetin, streptomycin, lincomycin, oxytetracycline, kanamycin, rifampicin, and vancomycin; low sensitivity to oxacillin, polymyxin, penicillin, bacitracin, gentamicin, ampicillin; not sensitive to methicillin and benzylpenicillin. In the production conditions, it was established that the relative humidity in the livestock premises in winter exceeds the maximum permissible limit by 16.36%. With an increase of humidity in the premises, the indicator of microbial pollution also exceeded the permissible limits in autumn – by 8.69%, in winter – by 25.21%, and in summer by 14.61%.

Non-observance of sanitary standards contributes to the occurrence of mastitis. In order to determine the specified risks, in subsequent studies, mastitis pathogens were monitored. It was experimentally established that the main causative agents of subclinical mastitis in experimental farms were *S. agalactiae* (20%), *S. aureus* (17%), *S. epidermidis* (15%), *E. fecalis* (12%), *E. coli* (10%), *Mycoplasma spp.* (8%), *Candida* (7%) and associated microflora (11%).

It has been proven that in the first lactation, an increase somatic cell count

(SCC) in the milk of cows was observed on the seventh day of the disease compared to before the onset of the disease by 87.4%; for the tenth – 143.0%; on the fifteenth – 17.0%, respectively. In cows of the second lactation, there is also a trend of increasing inflammation of the udder on the seventh day - 78.2%; on the tenth – 142%; on the fifteenth – 8.0%, respectively. Studies have established that SCC is positively correlated with the pathogenicity of the causative agent of mastitis and nMAFAnM. The incidence of mastitis in cows is closely related to the gastrointestinal tract, so the work determined the effect of *Bacillus megaterium* on the digestive system. At a dose of 15.0 g per animal, *B. megaterium* (1×10^9 CFU/g) contributed to an increase in the number of *Lactobacillus spp.* by 10.0% and *Bifidobacterium* by 12.0% compared to the control. There was slight suppression of conditionally pathogenic microflora. Increasing the dose of *B. megaterium* (1×10^9 CFU/g) to 25.0 g per animal had a positive effect on the microbiota of the gastrointestinal tract. At the same time, the level of beneficial microflora increased due to *Lactobacillus spp.* by 35.0% and *Bifidobacterium* by 30.0% compared to the control.

According to the results of the conducted research, it can be said that the use of *Bacillus megaterium* (1×10^9 CFU/g) at a dose of 35 g per animal had the maximum positive pronounced effect on the gastrointestinal microflora of cows. At the same time, the number of *Lactobacillus spp.* was more by 67% and *Bifidobacterium* by 58% compared to the control. In addition, the level of opportunistic microflora decreased: *Escherichia coli* – by 45.0%, *Clostridium* – by 27.0%, *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus* – by 75.0%, *Candida* – by 80.0%, compared to the control.

In order to determine the effect of the experimental probiotic on the animal body, the effect of the probiotic on the cows metabolism with subclinical mastitis was determined. Based on the results of the research, it was established that the level of metabolites in the blood of sick cows at the end of the treatment period was lower due to AST by 53.69% and ALT by 51.33%. The results confirm the absence of toxic effects of the probiotic used for the treatment of mastitis in cows.

In addition, it is proved that the use of *B. megaterium* (1×10^9 CFU/g) in a dose of 35.0 g per animal has a therapeutic effect on the body as a whole and a reduction of inflammatory processes in the udder of cows. These results are confirmed by the somatic cells count (SCC), which at the end of the study is reduced by 70 times compared to the beginning of the experiment in cows with subclinical mastitis that corresponds to the "Extra" class.

To determine the effect of *B. megaterium* NCH 55 on milk productivity of cows an experiment was conducted in production conditions. With concentrated feeds, cows suffering from subclinical mastitis were fed spores of *B. megaterium* NCH 55 (1×10^9 CFU/g) at a dose of 35.0 g per animal for 30 days. During the experiment, the quality of the obtained milk and the milk productivity of the experimental animals were determined.

Cow UA8014876120 in June had a lactation of 14 kg/day, nMAFAnM 560×10^3 CFU/cm³ and SCC 800×10^3 CFU/cm³, which indicates inflammation of the udder. Probiotic treatment was carried out in June, and productivity increased by 85.7%; nMAFAnM decreased by 44.64% and SCC decreased by 51.87%. In August, the productivity of the cow increased to 34 kg/day, while the quality indicators of milk corresponded to the "Extra" class. Animal UA8010629706 had a productivity of 37 kg/day at the beginning of the study, but from March to June, these indicators ranged from 21 to 28 kg/day, which was associated with a change in feed and an increase in nMAFAnM by 250% and SCC by 152.94 %. The treatment period in July was 30 days. At the end of the experiment in August, the milk productivity reached 35 kg/day, the quality of the milk corresponded to the "Extra" class. Cow UA8013283674 had high productivity from February to May at the level of 35-37 kg/day, but the quality of milk deteriorated. In June, the indicators of nMAFAnM increased by 428.57% and SCC - by 515%, which indicates the development of subclinical mastitis. After treatment based on *Bacillus megaterium*, the productivity returned to the initial indicators, the quality of milk corresponded to SSU 3662:2018.

From February to June, the productivity of cow UA8013420982 was at the

level of 14-15 kg/day with a gradual deterioration of milk quality. Probiotic therapy in July allowed to increase productivity by 86.6%; the content of nMAFAnM decreased by 61.19% and SCC - by 125%, compared to the beginning of the study. A similar pattern of subclinical mastitis development was observed in animal UA6100439832. As a result of the treatment in August, productivity indicators practically did not differ from the initial ones; the level of nMAFAnM decreased by 140% and SCC - by 342.30%. At the same time, it was established that the quality of the milk corresponded to the "First" class.

Cow UA8013283631 during the months of March and July had a productivity of 20-25 kg/day. The milk quality deteriorated in June, after which the animal was treated with a probiotic. At the end of the experiment, productivity increased by 31.81%, nMAFAnM decreased by 62.84% and SCC decreased by 42.50%, which corresponds to the "Higher" class.

Animal UA8012102570 showed low milk productivity and quality. Therefore, in July, a treatment scheme based on *Bacillus megaterium* was applied to the cows. At the end of the experiment in August, the cow productivity increased by 75%; decreased nMAFAnM - by 81.42% and SCC - by 45.34%, milk according to SSU 3662:2018 corresponded to the "Extra" class.

In May and June, cow UA8013283670's milk yield decreased and milk quality deteriorated. At the end of the experiment in August, productivity increased by 28%, nMAFAnM decreased by 29% and SCC decreased by 47.61%. The productivity of cow UA8014655883 in June was high, but the quality of milk deteriorated. The animal productivity increased by 18.75% at the end of the experiment; at the same time, nMAFAnM decreased by – 233.33%; and SCC – by 124.35%.

From May to June, the milk productivity of animal UA8014703811 gradually decreased, and the number of microorganisms and somatic cells in the milk also increased. After treatment, the productivity of the cow increased by 20%; nMAFAnM decreased by 68.95% and SCC by 77.5%.

During the research, an improvement in the general condition of the animals

was noted. Cows' appetite increased and milk yield gradually increased. Also, at the end of the experiment, milk productivity were in 40% of cows – 34-35 kg/day; 30% – 30-32 kg/day and 30% – 25-29 kg/day.

In 70% of the cows, which on the 30th day of research achieved a productivity of more than 30 kg/day, milk parameters such as somatic cells count ($SCC \leq 400$ thousand/cm³) and nMAFAnM (≤ 100 thousand CFU/cm³) corresponded to the "Extra" class.

Cows that did not reach a productivity of 30 kg/day were continued the treatment individually. At the same time, the somatic cell count in cows' milk was ≤ 500 thousand/cm³ and nMAFAnM ≤ 200 thousand CFU/cm³. Such milk is suitable for consumption, but conforms the technical conditions of the "Higher" or "First" classes and is sold at a lower cost. We consider that the recovery period of animals suffering from subclinical mastitis depended on the degree of damage to the mammary gland and the individual characteristics of the body. It is rather difficult to monitor the effect of a probiotic drug in the animal body, since this effect is multi-vector.

Thus, researchers have proven that probiotics are not necessarily aimed only at restoring the microbial community, since, for example, some types of probiotics increase the resistance of the animal body to colonization by pathogens, as well as to their destruction. *Bacillus megaterium* is the largest of the *Bacillus* family. *Bacillus megaterium*, multiplying, creates a specific environment, improves the microflora of the rumen. In addition, *Bacillus megaterium* destroys pathogenic microorganisms due to the production of a highly specific antimicrobial protein – megacin.

According to the results of the study, it was found that *S. aureus* was isolated in 22% of the milk samples of cows suffering from subclinical mastitis. Somatic cells in the milk of a healthy cow are represented mainly by epithelial cells, single segmented neutrophils, monocytes and basophils. In the milk of cows with subclinical mastitis, there is a tenfold increase in epithelial cells, lymphocytes, and basophils; neutrophils and monocytes.

Research has established that during the development of udder inflammation in the milk of cows, the somatic cell count and microorganisms increases and milk yield decreases simultaneously. Also, the productivity of experimental animals decreases in the transitional winter-spring period due to a change in feed and climatic conditions. Treatment of cows with subclinical mastitis with the probiotic *B. megaterium* NCH 55 strain made it possible to increase the productivity of 70.0% of the animals and improve the quality of milk to the "Extra" class.

Based on the research results, a scheme for the use of *B. megaterium* NCH 55 for dairy cows for the treatment and prevention of subclinical mastitis using a complex approach is proposed. Studies have proven that the use of *Bacillus megaterium* in a dose of 15 g to animals for 30 days contributed to the reduction of microflora in milk by 18% and the somatic cell count by 33.5%, compared to the beginning of treatment. An increase in the dose of *Bacillus megaterium* to 25 g in a cow resulted in a decrease in nMAFAnM by 21.2% and SCC by 58.2%, compared to the beginning of the study. The return of milk indicators to the extra class occurred when the animals were given *Bacillus megaterium* in a dose of 35 g for a month. At the same time, the number of microflora in milk decreased by 40.2% and the somatic cell count by 87.9%. An important result is the effective treatment of cows from subclinical mastitis without the use of antimicrobial agents, as well as the improvement of the microbiome.

Based on the research results, a scheme for the use of *Bacillus megaterium* NCH 55 was developed. It has been proven that feeding animals with *B. megaterium* at a dose of 15 g led to a decrease in milk of nMAFAnM by 18.0% and SCC by 33.5%; in the dose of 25 g of nMAFAnM by 21.2% and SCC – 58.2%, in the dose of 35 g of nMAFAnM by 40.2% and SCC – 87.9%, the milk corresponded to the "Extra" class.

Key words: calves mastitis, somatic cells, probiotic, microbial antagonism, microorganisms, milk quality, milk productivity.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Scopus:

1. Shkromada, O., Pikhtirova, A., **Tytukh, Ya.**, Baydevliatov, Yu., & Fotin, A. (2022). Treatment of subclinical mastitis of cows with probiotics. *Scientific Horizons*, 25(1), 30-40. [https://doi.org/10.48077/scihor.25\(1\).2022.30-40](https://doi.org/10.48077/scihor.25(1).2022.30-40) (Здобувач проводив збір та аналіз первинних даних, інтерпретацію результатів).

Наукові праці опубліковані в виданнях країн ЕС:

2. **Tytukh, Y.**, Musiienko, Y., & Grebenik, N. (2021). Application of bacillus megaterium for subclinical mastitis in cows. *Technology Transfer: Innovative Solutions in Medicine*, 32-34. <https://doi.org/10.21303/2585-6634.2021.002137> (Здобувач провів експериментальні дослідження, проаналізував отримані результати й оформив статтю).

Наукові праці, опубліковані у наукових фахових виданнях України:

3. Гребенік, Н. П., & **Титух, Я. В.** (2021). Визначення ефективності дії bacillus megaterium за субклінічного маститу корів. *Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин*, 22(2), 103-109. <https://doi.org/10.36359/scivp.2021-22-2.11> (Здобувач провів експериментальні дослідження, проаналізував отримані результати й оформив статтю)

4. **Титух, Я.** (2021). Моніторинг різних форм маститу у господарствах Сумської області. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*, (1 (52), 45-50. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.1.7>

5. **Титух, Я. В.** (2022). Визначення впливу збудників маститу на склад молока. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*, (2 (53), 33-38. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.2.5>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. **Титух Я.В.** Використання пробіотиків за субклінічного маститу у корів II Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині» (м. Львів, Україна, 18-19 листопада 2021 року), С.150-151.

7. **Титух Я.В.** Причини виникнення субклінічного маститу у корів. Матеріали науково-практичної конференції викладачів, аспірантів та студентів Сумського НАУ, 19 квітня 2021 року: тези доповіді. С. 210.

8. **Титух Я.В.** Визначення впливу стану шлунково-кишкового тракту на здоров'я молочної залози. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та здобувачів освіти «Наукові здобутки у вирішенні актуальних проблем виробництва і переробки продукції тваринництва» 16 грудня 2021 року, м. Житомир, С. 134.

Методичні рекомендації

9. **Титух Я.В., Шкромада О.І. Мусієнко Ю.В.** «Розробка альтернативних методів лікування дійних корів за субклінічного маститу». Суми, 2022. 30 с. (затверджені Вченою радою СНАУ, протокол № 12, від 25.04.2022 року). *(Здобувач проаналізував результати досліджень, підготував та оформив матеріали для методичних рекомендацій).*

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	21
ВСТУП.....	22
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1 Розповсюдженість захворювань молочних корів на різні форми маститу у господарствах.....	28
1.2 Причини виникнення субклінічного маститу у дійних корів	33
1.3 Сучасні методи діагностики та механізм розвитку субклінічного маститу	38
1.4 Альтернативні методи лікування та профілактики субклінічного маститу корів	43
1.5 Висновки з огляду літератури	50
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	52
2.1 Матеріали досліджень.....	52
2.2 Методи досліджень	54
РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	60
3.1 Дослідження властивостей штаму <i>B. megaterium</i> NCH 55	60
3.1.1 Дослідження вірулентності штаму <i>B. megaterium</i> NCH 55.....	60
3.1.2 Визначення антагоністичної активності <i>Bacillus megaterium</i> NCH 55.....	63
3.1.3 Дослідження мікроскопічних та біохімічних властивостей штаму <i>B. megaterium</i> NCH 55	67
3.2 Дослідження мікроклімату у приміщеннях для утримання дійного стада.....	73
3.3 Моніторинг збудників маститу у господарствах	75
3.4 Дослідження якості молока корів за субклінічного мастит	78
3.5 Вплив <i>Bacillus megaterium</i> на мікрофлору шлунково-кишкового тракту корів.....	88

3.6. Визначення впливу пробіотика на метаболізм корів за субклінічного маститу	90
3.7. Вплив <i>Bacillus</i> на продуктивність корів	95
3.8. Схема застосування <i>B. megaterium</i> NCH 55 для дійних корів для лікування та профілактики субклінічного маститу	104
УЗАГАЛЬНЕННЯ, АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	108
ВИСНОВКИ	119
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	122
ДОДАТКИ	147

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- БГКП – бактерії групи кишкової палички
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
- ГОСТ – Міждержавний стандарт
- ДСТУ – Національний стандарт України
- ЄС – Європейський Союз
- КСК – кількість соматичних клітин у молоці.
- КУО – колонієутворювальні одиниці
- МАФАНМ – мезофільні аеробні і факультативно анаеробні мікроорганізми
- МПА – м'ясопептонний агар
- МПБ – м'ясопептонний бульйон
- ОД – одиниці дії
- СК – соматичні клітини
- СМ – субклінічний мастит
- СОТ – Світова організація торгівлі
- ТОВ – товариство з обмеженою відповідальністю
- ТУ У – Технічні умови України
- ШКТ – шлунково-кишковий тракт
- ВРХ – велика рогата худоба

ВСТУП

Актуальність теми. Захворювання корів на мастит має великий вплив на біологічну безпеку господарства [26, 144]. Через високу поширеність і складну етіологію виникнення мастит великої рогатої худоби відноситься до захворювань, що важко лікуються. Мастит негативно впливає на здоров'я молочних корів і якість молока. Зміна складу молока широко досліджувалися при маститі, але недавні дослідження показали, що шлунково-кишкові мікроорганізми також мають вирішальний вплив на запалення інших периферичних тканин і органів, включаючи молочну залозу [11].

Субклінічний мастит має прихований і тривалий інкубаційний період. Хоча вим'я корів не має видимих змін зовнішнього вигляду, відбувається збільшення вмісту соматичних клітин та мікроорганізмів в молоці [104]. Зазвичай мастит на молочних фермах практикуючі ветеринарні лікарі лікують антибіотиками. Однак процес зазнає рецидиву, що призводить до постійного зниження надоїв та якості молока. Крім того, відбувається звикання мікроорганізмів до поширених протимікробних засобів і призводить до виникнення антибіотикорезистентності [14]. Хоча кількість соматичних клітин широко застосовується для діагностики здоров'я вим'я, на цей показник можуть впливати безліч факторів. Тому для підвищення точності діагностики маститу використовуються інтегровані підходи, наприклад, комбінація каліфорнійського тесту на мастит, значення рН молока ферментного тесту [142].

Якість і безпека сирого коров'ячого молока дуже важлива для молочних компаній і споживачів молочної продукції. Завдяки методам виробництва неможливо повністю усунути забруднення молока мікроорганізмами, тому мікробний вміст молока є основною ознакою при визначенні його якості. Інші важливі фактори, які слід враховувати, включають кількість соматичних

клітин, залишки ветеринарних препаратів, склад молока та температуру замерзання. Соматичні клітини представляють здоров'я вимені і можуть використовуватися для моніторингу субклінічного маститу. Високий рівень соматичних клітин може підвищувати протеоліз у молоці, що впливає на технологічні процеси. Ветеринарні препарати, які дають коровам, можуть призвести до утворення залишків у молоці, які є шкідливими для людини [164].

Мастит, викликаний мікроорганізмами, вважається найбільш небезпечним для корів, приносить значні економічні збитки для господарства через ветеринарні витрати на лікування та зменшення молочної продуктивності. Мастити у корів виявляють у клінічній та субклінічній формі. Має важливість ранньої діагностики захворювання та визначення етіологічних факторів у господарстві за різними методиками. На фермі є достатньо причин, що сприяють розвитку та поширенню маститу у стаді. Не дотримання санітарних норм під час доїння та порушення дезінфекції доїльного обладнання призводить до швидкого розповсюдження збудників маститу серед тварин. Своєчасне виявлення хворих тварин у стаді та їх ізоляція для лікування значно зменшує поширення маститу на фермі.

Також запалення вим'я корови призводить до зниження якості та безпечності молока через збільшення в ньому соматичних клітин та мікроорганізмів, що становить небезпеку для споживачів [89]. Обмеження використання антибіотиків для лікування тварин призвело до необхідності пошуку нових ефективних та безпечних методів лікування [136].

Слід зазначити, що недавні дослідження показали, що мікрофлора шлунково – кишкового тракту має важливу роль в запаленні тканин поза межами кишечника, наприклад, молочної залози. Дизбактеріоз мікробіому шлунково-кишкового тракту може бути однією з причин маститу [33]. Пробіотики можуть проникати в епітелій кишечника і досягати тканини вимені через кровообіг, діючи як ефективний стимулятор імунітету [68]. Науковці у своїх дослідженнях висунули припущення про зв'язок між

середовищем шлунково-кишкового тракту і станом здоров'я молочної залози [12, 149].

У дисертаційному дослідженні запропонований метод лікування субклінічного маститу із застосуванням пробіотичного штаму бактерій – *Bacillus megaterium* NCH 55.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є окремим фрагментом науково-дослідної роботи Сумського національного аграрного університету за темою «Вивчення патогенетичних механізмів розвитку запальної реакції, метаболічних та імунологічних процесів протидії біотичних та абіотичних факторів за акушерсько-гінекологічної та хірургічної патології в тварин» (державний реєстраційний номер 0121U107733).

Мета та завдання досліджень. Мета роботи – клініко-експериментальне обґрунтування й розробка альтернативного методу лікування корів за субклінічного маститу з використанням пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* NCH 55, а також схеми його застосування та ефективної терапевтичної дози.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання:**

- дослідити вірулентність штаму *Bacillus megaterium* NCH 55
- визначити антагоністичну активність *Bacillus megaterium* NCH 55
- дослідити мікроскопічні та біохімічні властивості штаму *Bacillus megaterium* NCH 55;
- дослідити мікроклімат у приміщеннях для утримання дійного стада корів;
- провести моніторинг збудників маститу корів у господарствах;
- дослідити якість молока корів за субклінічного маститу;
- дослідити вплив *Bacillus megaterium* NCH 55 на мікрофлору шлунково-кишкового тракту у корів;
- визначити вплив *Bacillus megaterium* NCH 55 на метаболізм корів за субклінічного маститу;

- дослідити вплив *Bacillus megaterium* NCH 55 на продуктивність корів;
- розробити схему застосування *Bacillus megaterium* NCH 55 для дійних корів.

Об'єкт дослідження – зміни у молочній залозі за субклінічного маститу, метаболізм тварин, мікробіом шлунково-кишкового тракту та продуктивність корів за використання пробіотику.

Предмет дослідження – протимікробні, імуностимулюючі, метаболічні властивості *Bacillus megaterium* NCH 55, терапевтична ефективність використання пробіотику за субклінічного маститу.

Методи дослідження. У роботі використані такі методи досліджень: клінічні (визначення клінічного стану тварин), аналітичні (аналіз літературних джерел, узагальнення результатів досліджень), протимікробні (визначення протигрибкових та бактерицидних властивостей), метаболічні (вплив на органи і системи організму), мікробіологічні (визначення складу шлунково-кишкової мікрофлори); фізіологічні (вплив на продуктивність тварин), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні був застосований у виробничих умовах молочного господарства пробіотичний штам *Bacillus megaterium* NCH 55 для молочного стада. Розроблено схему його застосування для лікування корів за субклінічного маститу. Визначені ефективні дози та вплив на якість отриманої продукції. Досліджені протимікробні властивості *Bacillus megaterium* NCH 55 стосовно збудників субклінічного маститу у корів. Доведено відновлення молочної продуктивності корів за використання пробіотику. Встановлений позитивний вплив *Bacillus megaterium* NCH 55 на формування мікрофлори шлунково-кишкового тракту у корів.

Вперше в Україні запропонований пробіотик для лікування субклінічного маститу корів як альтернатива протимікробним засобам. Встановлено покращення метаболізму та функціонування органів та систем

молочних корів за субклінічного маститу.

За використання пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* NCH 55 зафіксовано збільшення молочної продуктивності корів та лікувальний ефект за субклінічного маститу корів. Доведений терапевтичний ефект за використання *B. megaterium* NCH 55 для дійних корів у господарстві.

Практичне значення одержаних результатів. На основі проведених досліджень розроблено інструкцію по застосуванню пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* NCH 55, за рахунок чого проведена реєстрація та впроваджено у серійне виробництво в ПП «Кронос Агро» пробіотичної добавки.

Результати роботи увійшли до практичних занять та курсу лекцій з дисципліни «Превентивна, етіотропна, патогенетична, симптоматична та замісна терапія в акушерстві, гінекології» та «Акушерство та гінекологія» при підготовці студентів у галузі 21 «Ветеринарна медицина» зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Сумському національному аграрному університеті.

На основі дисертаційної роботи створені методичні рекомендації «Розробка альтернативних методів лікування дійних корів за субклінічного маститу», які можуть бути використані для підвищення обізнаності практикуючих лікарів ветеринарної медицини у господарствах, та в якості додаткового наукового літературного джерела для самостійної роботи студентів, лекційних та лабораторно-практичних занять зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».

Пробіотичний штам *Bacillus megaterium* NCH 55 пройшов виробничу перевірку у господарствах: у ТОВ «Агорфірма Лан» с. Кіндратівка, Сумського району, Сумської області; ТОВ «Комишуватський МК» с. Миколо-Комишувата, Красноградського району, Харківської області.

Особистий внесок здобувача. Здобувач проводив моніторинг та підбір літературних джерел за напрямом наукового дослідження. Разом із залученням керівника проводив виробничі та лабораторні дослідження у

господарствах. Самостійно здійснив узагальнення, статистичний аналіз та інтерпритацію отриманих результатів. За участі керівника були розроблені методика та планування досліджень, обговорення результатів, висновки та пропозиції виробництву.

Апробація результатів досліджень. Основні положення дисертації викладено на Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів Сумського національного аграрного університету 2018-2022 р.р.; на IX Міжнародній науково-практичній конференції «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування (м. Львів, Україна, 19-22 вересня 2021 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині» (м. Львів, Україна, 18-19 листопада 2021 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Technology transfer: innovative solutions in medicine» (м. Таллін, Естонія, 29 жовтня 2021), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та здобувачів освіти «Наукові здобутки у вирішенні актуальних проблем виробництва і переробки продукції тваринництва» (м. Житомир, Україна, 16 грудня 2021 року).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 9 наукових праць, у тому числі 1 – у науково-метричних базах (Scopus), 1 – у фаховому виданні країн ЄС, 3 – у наукових фахових виданнях України, 3 – у матеріалах конференцій, 1 науково–методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 120 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 17 таблицями та 8 рисунками і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, результатів власних досліджень, узагальнення, аналізу та обговорення отриманих результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Список використаних джерел літератури включає 167 найменування, з яких 158 – іноземною мовою.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Розповсюдженість захворювань молочних корів на різні форми маститу у господарствах

Мастит великої рогатої худоби – це запалення молочних залоз (інтрамаммарне запалення) у корів. Захворювання спричинено в основному бактеріальними інфекціями, і на підставі епідеміології підрозділяється на два типи: контагіозний мастит і мастит, викликаний бактеріями з навколишнього середовища [47]. Причиною контагіозного маститу є патогенні бактерії, в тому числі *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) і *Mycoplasma spp.*, які передаються від інфікованої корови здоровій корові зазвичай під час доїння через руки, рушники або доїльний апарат, який діє як резервуар для бактерій. Інший тип маститу пов'язаний з мікроорганізмами, які поширюються в основному за межами доїльного залу, тобто бактерії-збудники потрапляють з навколишнього середовища. Для них природнім субстратом розмноження є підстилка, ґрунт, гній, фекалії і вода [67].

Мастит у великої рогатої худоби є важливою економічною проблемою в усьому світі, включаючи Канаду [12], Німеччину [68], Сполучене Королівство [28], Нідерланди [73] і Сполучені Штати Америки [65]. Мастит великої рогатої худоби пов'язаний зі щоденною втратою від 1,0 до 2,5 кг молока протягом перших двох тижнів після початку і загальної втратою від 110 до 552 кг протягом всієї лактації в залежності від кількості і часу виникнення. Захворювання також має тривалий вплив на надої, оскільки корови не відновлюють свій піковий удій в решту лактації. Незважаючи на різні передові методи управління розведенням великої рогатої худоби в молочному секторі, мастит і зараз залишається серйозною хворобою і однією з основних

економічних проблем фермерів і власників молочних господарств. Крім того, споживання молока, ураженого маститом, може бути шкідливим для людини, оскільки патогени, стійкі до протимікробних препаратів, можуть передаватися через заражене непастеризоване молоко; отже, це також серйозна небезпека для громадської охорони здоров'я [119]. Крім того, ризики для здоров'я, пов'язані з підвищеною стійкістю мікробів і залишками антибіотиків в молоці, призвели до збільшення споживчого попиту на органічні продукти, оскільки вони вироблені за допомогою традиційних сільськогосподарських систем, більш здорові і безпечні для споживання [135]. Через зоонозної загрози молоко при маститі не можна вживати і продавати, що призводить до великих економічних втрат [139]. Заражене вим'я знижує вартість тварин на ринку і лягає економічним тягарем на власника через витрати на лікування.

Через високу поширеність і складну етіологію виникнення мастит великої рогатої худоби відноситься до захворювань, що важко лікуються. Захворювання негативно впливає на здоров'я молочних корів і якість молока. Зміна складу молока широко досліджувались при маститі, але дослідження показали [10], що шлунково-кишкові мікроорганізми також мають вирішальний вплив на запалення інших периферичних тканин і органів, включаючи молочну залозу [56].

Основними проявами клінічного маститу є підвищення температури тіла, почервоніння і біль вимені, інфільтрація запальних клітин, набряк ацинарних протоків, що призводить до збільшення кількості соматичних клітин у молоці і зниження надою [25]. Навпаки, субклінічний мастит має прихований і тривалий інкубаційний період. Хоча вим'я корів не має видимих змін зовнішнього вигляду, відбувається збільшення вмісту соматичних клітин та мікроорганізмів в молоці [132].

Зазвичай мастит на молочних фермах практикуючі ветеринарні лікарі лікують антибіотиками. Однак процес зазнає рецидиву, що призводить до постійного зниження надоїв та якості молока. Крім того, відбувається

звикання мікроорганізмів до поширених протимікробних засобів, що призводить до виникнення антибіотикорезистентності [157]. Хоча кількість соматичних клітин широко застосовується для діагностики здоров'я вим'я, на цей показник можуть впливати безліч факторів. Тому для підвищення точності діагностики маститу використовуються інтегровані підходи, наприклад, комбінація каліфорнійського тесту на мастит, значення рН молока, ферментного тесту [53].

Відповідно до Регламенту (ЄС) Європейського Парламенту та Ради Європейського Союзу № 852/2004 та № 853/2004 «Про гігієну харчових продуктів» від 29 квітня 2004 року українські виробники як пастеризованих, так і коров'ячого сирого молока керуються нормативними актами, зокрема ДСТУ 2661:2010 «Молоко коров'яче питне». Загальні технічні умови» та ДСТУ 3662:2015 «Молоко коров'яче-сире. Технічні умови», які гармонізовані до вимог ЄС і регламентують безпеку та якість молока для дотримання належних санітарно-гігієнічних вимог при його первинному виробництві, промисловій переробці, використовують сучасний, ефективний, розроблений та перевірений швидкий контроль молока та молочних продуктів для їх фальсифікації [32].

Слід зазначити, що дослідження показали, що мікрофлора шлунково – кишкового тракту має важливу роль в запаленні тканин поза межами кишечника, наприклад, молочної залози. Дисбактеріоз мікробіому шлунково-кишкового тракту може бути однією з причин маститу [102]. Пробіотики можуть проникати в епітелій кишечника і досягати тканини вимені через кровообіг, діючи як ефективний підсилювач імунітету [45]. Науковці у своїх дослідженнях висунули припущення про зв'язок між середовищем шлунково-кишкового тракту і станом здоров'я молочної залози [63]. Також доконаним фактом є взаємозв'язок між захворюванням тварин на кетоз та субклінічний мастит [165].

Враховуючи попередні дослідження науковців в роботі запропонований метод лікування субклінічного маститу із застосуванням пробіотиків.

Мастит, спричинений інфекційними збудниками, досі вважається згубним для молочних тварин, впливає на їх добробут, а також несе величезні економічні збитки молочній галузі через зниження продуктивності та збільшення вибракування хворих тварин. Запалення молочних залоз (вимені) великої рогатої худоби в більшості випадків спричинене бактеріальними збудниками. Звичайна діагностика ґрунтується на розпізнаванні клінічної та субклінічної форм захворювання. Це підкреслює важливість ранньої та швидкої ідентифікації етіологічних агентів на рівні ферми, для якої розроблено декілька діагностичних методик.

Існує багато причин, які сприяють виникненню та поширенню маститу у господарствах серед молочного стада. Не належний санітарний стан приміщень та нехтування проведенням санації вим'я перед доїнням може спияти поширенню збудників маститу у стаді. Своєчасна діагностика та терапія субклінічного маститу у тварин в господарствах зменшує ризик поширення цього захворювання.

Мастит має великий вплив на добробут тварин. Також це негативно позначається на прибутках фермерів і призводить до великих втрат виробництва в молочному секторі в усьому світі [26, 144].

Мастит великої рогатої худоби призводить до збільшення витрат на ветеринарне обслуговування тварин. Більш того, це також негативно впливає на склад молока, а також на його цінність [89]. Мастит в значній мірі залежить від методів лікування; і, таким чином, вимагає більш досконалих технічних і біологічних методів, а також відповідних заохочень і стимулів [161].

Фермери та ветеринарні лікарі повинні працювати відповідно до офіційних інструкцій по використанню обов'язкових протимікробних засобів [100]. Протягом останнього століття були досягнуті значні успіхи в боротьбі з маститом; але через мінливу динаміку популяції, структури стада і більш суворих стандартів переробників, мастит стає складною хворобою і залишається головною проблемою молочної промисловості. Таким чином,

необхідні подальші дослідження в цій області [136].

Клінічний та субклінічний мастити у дійних корів дуже поширене захворювання, яке призводить до значних економічних збитків через зменшення удою, якості молока та витрат на його лікування та профілактику.

В середньому загальні витрати на ліквідацію наслідків через мастит великої рогатої худоби оцінюються в 147 доларів на корову в рік, зокрема, за рахунок втрат виробництва молока і вибракування, що становить від 11 % до 18 % валового прибутку на одну корову в рік. На пошкодження тканин молочної залози, що призводить до зниження продуктивності молока, припадає 70 % загальних втрат [74].

Мастит великої рогатої худоби можна поділити на три класи в залежності від ступеня запалення, а саме клінічний, субклінічний і хронічний мастит. Клінічний мастит легко виявляється за наочними ознаками, таким як почервоніння і припухлість виміні, гарячка у дійної корови. Молоко у хворої тварини набуває водянистої консистенції, з пластівцями та згустками [167].

Клінічний мастит поділяють на гостру і підгостру форму в залежності від ступеня запалення [66, 97]. Важкі випадки клінічного маститу також можуть привести до летального випадку [96].

Також хронічний мастит – це тривалий запальний процес, з нерегулярними клінічними загостреннями. На відміну від клінічного маститу, субклінічний мастит не має видимих відхилень у вимені або молоці, але виробництво молока знижується зі збільшенням кількості соматичних клітин (КСК) [9]. Втрати, спричинені субклінічним маститом, дуже важко визначити кількісно через запізнілу діагностику. Експерти [95, 132] сходяться на тому, що субклінічний мастит призводить до більших фінансових втрат в стаді, ніж клінічні випадки.

1.2 Причини виникнення субклінічного маститу у дійних корів

Причиною маститу можуть бути механічні пошкодження вимені під час доїння. Багаторічний досвід експлуатації доїльних апаратів засвідчує, що дійкова гума була й залишається недовговічною й ненадійною ланкою в технологічному процесі машинного доїння. За час експлуатації гума швидко втрачає міцність і пружні властивості, стає жорсткою й менш еластичною, деформується, змінюючи форму [120].

Тому науковці намагаються вдосконалити доїльне обладнання для зменшення ризику травмування вимені корів. Проведені дослідження взаємодії очищувальних елементів пристрою для механічного очищення з забрудненням дійок вимені в процесі роботи. В результаті виробничих випробувань встановлено, що за використання розробленого пристрою добовий надій молока корів збільшився в середньому в 1,1 рази, що дозволило отримати 132,5 кг молока додатково. При цьому жирність молока підвищилась. Кількість мікроорганізмів зменшилася у 2,2 рази, а вміст кількості часток забруднення – у 4,6 рази [121].

Епітеліальні клітини молочної залози протягом багатьох років широко використовувалися як моделі для розуміння фізіологічної функції захворювання молочних залоз. З епітеліальних клітин вимені корів голштинської породи в Україні було створено культуру для дослідження унікальних характеристик епітеліальних клітин молочної залози великої рогатої худоби з метою розробки загальної моделі *in vitro* [39].

Субклінічний мастит викликає особливе занепокоєння, оскільки збудники контагіозного маститу можуть передаватися від інфікованих корів до здорових без наявних клінічних проявів. Бактеріологічний посів молока є золотим стандартом при виявленні субклінічного маститу [31]. На жаль, результати такого дослідження недоступні принаймні протягом 24–48 годин. Це означає, що бактеріальні патогени можуть поширюватися серед молочних корів до того, як будуть відомі результати посіву.

Каліфорнійський тест на мастит – це практичний, недорогий тест, який використовується для оцінки кількості соматичних клітин у молоці корів [141]. Ступінь запалення вимені залежить від збудника, активності його впливу та резистентності організму корови.

Вважається, що основним етіологічним фактором виникнення маститу у тварин є мікроорганізми. До них відносять грампозитивні і грамнегативні бактерії, а також патогенні збудники (наприклад, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.*) [40, 142].

Однак, як показує практика, часто першопричиною виникнення маститу, особливо субклінічного є низка факторів, таких як метаболічні захворювання (наприклад кетоз), порушення процесу доїння, зниження імунітету. Всі перелічені аспекти в більшості пов'язані із порушенням харчування та утримання продуктивних тварин.

Також в результаті проведених виробничих досліджень було встановлено, що частіше схильні до захворювання на мастит високопродуктивні тварини. Їх високий потенціал у молочній продуктивності вимагає дотримання норм у годівлі і уникнення ускладнень під час стресових періодів таких як зміни пори року, післяпологовий період, початок лактації. Особливо складно цей період проходять корови першої лактації, через непристосованість організму. Тому необхідно своєчасно усувати загрози, пов'язані із стресовими ситуаціями для молочних корів.

Також поліпшення санітарії [93] у процесі доїння, проведення санації сосків після доїння, технічне обслуговування доїльних апаратів, є загальними заходами щодо запобігання нових випадків маститу. Однак лікування бактеріального маститу залежить в основному від антибіотиків. Нажаль масове застосування антибіотиків збільшило загрозу виникнення резистентних штамів мікроорганізмів [43].

Крім того, збільшуються економічні збитки через застосування антимікробних засобів дійним коровам. Молоко після використання антибіотиків не можна вживати в їжу щонайменше протягом 20 діб. Також

постійний контроль маститу в стаді дає можливість уникнути його розповсюдження і переходу із субклінічної у клінічну форму. Через зазначені загрози ведеться пошук альтернативних методів лікування та профілактики субклінічного маститу.

Мікоплазматичний мастит все частіше реєструють молочних господарствах. Хоча роль основних збудників маститу на склад молока широко згадується в літературі, обмежена кількість інформації про вплив різних видів мікоплазм на кількісні та якісні показники молока.

Види мікоплазм мають глобальне поширення, викликаючи серйозні захворювання великої рогатої худоби в усьому світі, включаючи мастит, артрит, пневмонію, середній отит і репродуктивні порушення. Мікоплазми, дуже різні, здатні викликати важкі захворювання і є складними для лікування хвороби, які вимагають швидкої і точної діагностики для запобігання спалахам захворювань і боротьби з ними. У цьому дослідженні обговорюється розробка і використання різних діагностичних методів для виявлення видів *Mycoplasma*, що відносяться до великої рогатої худоби, з особливим акцентом на *Mycoplasma spp.*

Запалення вимені великої рогатої худоби можна розділити на 3 класу в залежності від ступеня запалення, а саме клінічний, субклінічний і хронічний мастит. Клінічний мастит великої рогатої худоби очевидний і легко виявляється по видимим відхилень, таким як червоне і опухле вим'я, а також лихоманка у дійної корови. Молоко у корови водянисте, з пластівцями і згустками [1]. Клінічний мастит можна поділити на гостру і підгостру в залежності від ступеня запалення [105]. Важкі випадки клінічного маститу також можуть привести до летального результату [16]. На відміну від клінічного маститу, субклінічний мастит не вказує видимих відхилень у вимені або молоці, але виробництво молока знижується зі збільшенням кількості соматичних клітин (КСК) [9, 95, 132]. Втрати, спричинені субклінічним маститом, дуже важко визначити кількісно, але експерти сходяться на думці, що на нього припадає більше фінансових втрат в стаді,

ніж на клінічні випадки [63]. Навпаки, хронічний мастит – це запальний процес, який триває кілька місяців з нерегулярними клінічними загостреннями. Етіологічні агенти включають безліч грампозитивних і грамнегативних бактерій та можуть бути як заразними (наприклад, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.*), так і негативними (наприклад, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus uberis*). Поліпшення санітарії, наприклад посилення гігієни доїння, проведення дезінфекції сосків після доїння, технічне обслуговування доїльних апаратів, є загальними заходами щодо запобігання нових випадків маститу.

Однак широке використання антибіотиків посилило побоювання з приводу появи стійких до антибіотиків патогенів, що призвело до скорочення використання антибіотиків в молочній промисловості. Тому ведеться пошук альтернативних методів лікування корів від маститу, зокрема, натуральних продуктів з рослин і тварин [89].

Рід *Mycoplasma* належить до класу *Mollicutes*, відповідає за багато хвороб великої рогатої худоби, включаючи порушення дихання, артрит, середній отит та мастит [110]. Мікоплазматичний мастит дуже стійкий до антимікробної терапії і його можна легко пропустити під час діагностичних панелей лабораторного посіву та перевірки сприйнятливості [80]. Серед 200 виявлених на сьогоднішній день видів мікоплазм, повідомляється, що деякі з них беруть участь у маститі великої рогатої худоби, такі як *M. bovis*, *M. bovigentialium*, *M. californium*, *M. bovirhinis*, *M. arginini*, *M. dispar*, *M. canadense*, *M. bovoculi* та *Mycoplasma spp.* [58]. У молочних стадах мікоплазми можуть викликати клінічний, субклінічний або хронічний мастит. *Mycoplasma spp.* вважається найпоширенішим збудником серед мікоплазм. Інкубаційний період мікоплазмійного маститу становить 10–14 днів, і протягом цього періоду може відбутися випадання збудника, що сприяє поширенню бактерій. Економічні наслідки мікоплазмійного маститу у великої рогатої худоби обумовлені зниженням виробництва молока, вартістю

впровадження контрольних процедур, діагностики та лікування [14]. Наприклад, вартість лікування від хворби, викликаної *Mycoplasma spp.* великої рогатої худоби становить понад 140 мільйонів доларів щорічно у США, а в Європі повідомлялося про ще більші втрати [123].

Бактеріологічний посів мікоплазм із зразків молока колись був найпоширенішим методом виявлення. Однак цей метод є відносно повільним, часто займає один-два тижні з потенційним повільним ростом цих бактерій через їх вимливість до культивування [163]. Мікоплазмійний мастит зазвичай виключається із загальних скринінгових тестів на мастит через його особливі вимоги до росту та затримки часу [33]. Подібним чином серологічний метод виявлення займає багато часу, оскільки на формування антитіл потрібно приблизно 2 тижні.

Крім того, існує різниця у вимогах до зростання різних видів мікоплазм, що, також, впливає на виявлення мікроорганізмів, особливо при одночасному зараженні мікоплазмою. Однак більшість діагностичних досліджень при маститі зосереджуються на переважних видах мікоплазм, пов'язаних з інфекцією, *M. bovis*, і не звертають уваги на інші збудники *Mollicutes* [159]. Дослідження клінічної інфекції мікоплазм також заслуговують більшої уваги, особливо для епідеміологічних та лікувальних досліджень. Тому необхідна розробка швидкого та надійного діагностичного методу, який би міг розрізняти різні роди та види мікоплазм.

Встановлення зв'язку між мікоплазмійним маститом, індивідуальною кількістю соматичних клітин (КСК) та надоем молока також потребує дослідження. Раніше повідомлялося про зв'язок між звичайними збудниками, що викликають мастит, такими як стрептококи та стафілококи, та підвищеним рівнем КСК [49]. Мікоплазмійний мастит також може впливати на склад КСК [155].

Помітне зниження виробництва молока було оцінено, зокрема, від маститу, викликаного *S. agalactiae*, *Mycoplasma spp.* та *Pasteurella spp.* [91]. Проте, вплив мікоплазмійного маститу порівняно зі звичайними

бактеріальними збудниками на склад молока ще належить оцінити. Крім того, необхідно дослідити патогенність кожної окремої *Mycoplasma spp.*, як окремої, так і в асоційованій інфекції.

1.3 Сучасні методи діагностики та механізм розвитку субклінічного маститу

Мастит молочних корів сприяє підвищенню резистентності до антимікробних препаратів, що є одним із найактуальніших глобальних викликів охорони здоров'я, що передбачає неправильну діагностику та зменшення використання антибіотиків [103, 104, 125]. Поки що запізніле та неякісне втручання при маститі великої рогатої худоби в основному пов'язане зі значними обмеженнями в методах, які зараз використовуються для діагностики, включаючи їхню вартість [22].

Діагностика маститу на фермі в основному базується на кількості соматичних клітин, хоча цей метод залежить від багатьох причин, таких як тип збудника та внутрішні фактори [52, 81]. Дослідження ґрунтується на нових знаннях, отриманих щодо біомаркерів, відповіді господаря, таких як прозапальні цитокіни, визначені як біомаркери маститу, щоб повідомляти про стан захворювання та його етіологію. Використовуючи наявність цих біомаркерів у молоці, можна застосувати підхід до «рідкої біопсії», щоб забезпечити неінвазивну, без стресу та швидку діагностику природного маститу великої рогатої худоби.

Мастит — це переважно бактеріальна інфекція; однак це також спричинено водоростями, вірусами, грибами або неправильними процедурами доїння [85, 108, 149]. *Prototheca spp.* є третім за поширеністю збудником маститу після *Streptococcus* і *Staphylococcus spp.* [84]. Мастит може проявлятися клінічними або субклінічними станами. Останні дані свідчать про те, що наслідки інфекції залежать від реакції організму-господаря на ранніх стадіях захворювання, включаючи вплив секретованих цитокінів [15,

114, 138]. Цитокіни — це білки, які відіграють важливу роль у міжклітинній комунікації. Існує безліч процесів, які стимулюються або пригнічуються цитокінами, наприклад клітинна диференціація, проліферація, ремоделювання, дегенерація, регенерація і навіть загибель клітин (апоптоз). Як експериментально індукований, так і природний мастит призводить до збільшення кількості соматичних клітин і рівнів вироблених цитокінів (інтерлейкіну (IL) IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL -8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A) у молоці [25]. Так само біохімічний аналіз молока надає безліч діагностичних можливостей у пошуку маркерів маститу.

Сімейство інтерлейкіну (IL)-1 (IL-1) є однією з найбільш широко представлених груп цитокінів [61]. Цитокіни сімейства IL-1 діють по відношенню до тканинних імунокомпетентних клітин через кілька сигнальних шляхів [51, 61], виконуючи в основному запальні, аутоімунні функції, що ініціюють фіброз і мутагенні процеси [60]. При експериментальному гострому маститі великої рогатої худоби інтерлейкін-1 альфа (IL-1 α) демонструє локальну модуляцію медіаторів захисту першої лінії, таких як простагландин (PG-F2 α) і лейкотрієн, що свідчить про його роль у ранньому запаленні [126].

Основними продуцентами IL-4 у молочних залозах великої рогатої худоби є Т- і В-лімфоцити, еозинофіли та базофіли, тучні клітини, плазматичні клітини [92], а також епітеліальні клітини, які разом складають основу імунітету 2-го типу [72]. Крім того, IL-4 регулює вроджений імунітет і має інгібуючу дію на інтерферон у молочних корів [25]. Однак у зв'язку з маститом виникає експресія IL-4 [55].

IL-6 є плейотропним цитокіном, який виконує багато різних функцій, таких як захист організму господаря шляхом виконання імунної відповіді, кровотворення та регуляції запалення [31, 94]. При маститі великої рогатої худоби IL-6 вважається раннім, але неспецифічним індикатором різних запальних станів, особливо при субклінічному маститі [33]. Навпаки, IL-6 істотно не відрізнявся між здоровими коровами та тваринами, ураженими

субклінічним маститом, що викликає сумніви щодо його зв'язку з іншими факторами.

IL-12 стимулює продукцію IFN- γ і проліферацію NK-клітин, цитотоксичність і спонукає NK-клітини виробляти цитокіни. Крім того, IL-12 сприяє проліферації та активації Т-клітин і забезпечує диференціювання імунних клітин [41]. Було вивчено збільшення IL-12 у молоці корів з природним маститом, що свідчить про його роль у вродженому імунітеті [158].

Тучні клітини та базофіли як ключові ефektorні клітини вродженого імунітету беруть участь у алергічних прозапальних реакціях шляхом секреції розчинних факторів типу I цитокіну IL-13 [88]. IL-13 у вимені великої рогатої худоби, молоці та його зв'язок із маститом вивчено недостатньо.

IL-17A є протизапальним цитокіном, який відіграє важливу роль у захисті організму від різних мікробних і немікробних патогенів. IL-17A виробляється кількома типами клітин як адаптивної, так і вродженої імунної системи [98]. При індукованому маститі великої рогатої худоби IL-17A опосередковує взаємодію між захистом і патогеном під час маститу [134].

Фактор некрозу пухлин (TNF)- α є протизапальним цитокіном, який в основному виробляється макрофагами. Залежно від локалізації його вивільнення та рецептора, з яким він буде зв'язуватися, він може виконувати різні функції, такі як стимуляція синтезу інших цитокінів і викликання запальних реакцій, контроль життєво важливих процесів клітини та підтримка тканинного гомеостазу [90]. IFN- γ – це цитокін, що секретується різними клітинами вродженого та адаптованого імунітету, а також антигенпрезентуючими клітинами, що мають особливості захисної імунної відповіді та елімінації збудників [83]. Разом з іншими вибраними цитокінами слід вивчати багатофункціональність TNF- α та IFN- γ при субклінічному та клінічному маститі великої рогатої худоби.

У молочній залозі великої рогатої худоби мРНК і відносні рівні експресії білка вказують на активізацію протизапальних цитокінів

(наприклад, TNF- α та IL-6).

Запальні протизапальні шляхи залучають основні регуляторні шляхи для належної імунної функції в молочних залозах [13]. Різні молекули, що вивільняються господарем на початкових стадіях інфекції, вже ідентифіковані як біомаркери для ранньої діагностики. Цікаво, що раніше повідомлялося, що їх експресія пов'язана зі збудником. Загалом дослідження цитокінів у бичачому молоці сприяють кращому розумінню ролі цих медіаторів у патогенезі маститу. Ці знання дозволяють припустити потенційне терапевтичне застосування та ідентифікацію діагностичних і прогностичних біомаркерів.

Знання про запальні та регуляторні цитокіни в молочних клітинах корів, які утримуються у вільному стані, і при природному маститі відсутні, оскільки більшість досліджень зосереджено на запаленні вимені, спричиненому патогенами. При маститах дослідження цитокінів у молоці є потенційним інструментом для ранньої та своєчасної діагностики та проспективного лікування на основі патогенезу.

Раннє виявлення субклінічного маститу великої рогатої худоби може покращити стратегії лікування та надій молока та зменшити використання антибіотиків. Тому наукові дослідження зосереджені на ідентифікації нових і менш дорогих біомаркерів. Одним із біомаркерів із найбільшим потенціалом є молочна лактоза. Щоб визначити, чи можна використовувати лактозу як індикатор субклінічного маститу, зразки молока з сімдесяти двох стад перевірили на збудники субклінічного маститу великої рогатої худоби. У цьому дослідженні оцінювали поширеність збудників субклінічного маститу, їхню сезонність і зв'язок із концентрацією лактози в молоці. Зразки молока були в основному інфіковані змішаною мікрофорою, коагулазонегативними та золотистими стафілококами. Дріжджі, *Enterococcus spp.* і коліформні бактерії, такі як *Escherichia coli*, були виявлені під час періоду випасу на пасовищах. Збільшення кількості соматичних клітин і зниження концентрації лактози були безпосередньо пов'язані з наявністю збудників субклінічного

мастити великої рогатої худоби. Ці результати показують, що зміни вмісту лактози можна відстежувати як діагностичний метод у профілактиці субклінічного маститу у корів [21].

Лактоза – це цукор-дисахарид, який складається з молекул глюкози та галактози та є основною твердою речовиною коров'ячого молока (вуглеводи становлять приблизно 40 % від загальної кількості твердих речовин і 50 % знежирених сухих речовин). На синтез і концентрацію лактози в молоці головним чином впливає здоров'я вимені та енергетичний баланс і метаболізм корови [105, 127]. Різні дослідження продемонстрували несприятливий зв'язок із негативним енергетичним балансом і пов'язаними метаболічними розладами з субклінічним маститом у високопродуктивних післяпологових молочних корів [42, 154]. Крім того, дослідники вказали на широке використання лактози в харчовій і фармацевтичній промисловості, а також на те, що молоко є основним джерелом лактози, яка використовується в промисловості [54]. Зареєстровані нижчі рівні лактози в молоці можуть бути використані для раннього виявлення метаболічних розладів і субклінічного маститу (встановлюється при вмісті соматичних клітин молока $\geq 1,0 \times 10^5$ клітин/мл). Рівень лактози в молоці корів був позитивно пов'язаний з їх репродуктивною здатністю.

Кілька досліджень показали, що лактоза може бути потенційним показником здоров'я корів [130]. Науковці [131] виявили, що корови з вмістом лактози $\leq 4,553$ % мали більш високий рівень погіршення здоров'я порівняно з коровами $\geq 5,045$ %. Автори також встановили, що субклінічний мастит генетично корелює з молочною лактозою, і що продуктивні корови генетично більш сприйнятливі до маститу, ніж менш продуктивні корови.

У коров'ячому молоці рівень лактози змінюється менше, ніж рівень жиру або білка [112], тому будь-яка несподівана зміна вмісту лактози може бути пов'язана з негативним енергетичним балансом або іншими станами поганого здоров'я. Зміни у відсотковому вмісті лактози можуть відбуватися через пошкодження секреторних клітин, спричинене запаленням та

інфекцією, а також через використання молока як субстрату для вирощування збудників субклінічного маститу. Крім того, кількість активності води безпосередньо пов'язана з відсотком лактози, оскільки вона осмотично визначає поглинання води з клітинного цитозолу та крові.

Загалом вміст лактози в цьому дослідженні був нормальним і відповідав діапазонам, зазначеним у літературі, які, за даними різних авторів, коливаються від 4,28 до 4,70% [129]. Незважаючи на це, вміст лактози був пов'язаний з наявністю соматичних клітин і збудників субклінічного маститу в пробах молока. Найбільша втрата вмісту лактози спостерігалась у зразках молока, де *S. agalactiae*, *S. aureus* та інші штами *Streptococcus*.

Дослідники [30] виявили, що молоко, вироблене коровами, інфікованими збудниками маститу, мало нижчий вміст лактози, але статистичних відмінностей між збудниками заразного та умовно-патогенного маститу не спостерігалось. Нижчий вміст лактози також описано в молоці з коагулазонегативним стафілококом [44], *S. aureus* [59], коліформними бактеріями та грибовими [95] інфекціями. Значне зниження вмісту лактози спостерігалось також у зразках молока з дріжджовою інфекцією. До сьогодні немає даних про зниження лактози під час дріжджового маститу, але деякі дріжджі, такі як *Candida* здатні ферментувати лактозу до спирту [82]. Корови з вищою концентрацією лактози ($\geq 4,70\%$) були зареєстровані як більш активні та мали менший ризик маститу та метаболічних розладів. Корови з вищою концентрацією лактози в молоці також мають вищу ймовірність запліднення [151].

1.4 Альтернативні методи лікування та профілактики субклінічного маститу корів

Резистентність до антибіотиків викликає велике занепокоєння у зв'язку з впливом на громадське здоров'я. Стійкі до антибіотиків бактерії, пов'язані з

хворобами тваринами, можуть бути патогенними і для людини, легко передаватися через харчові ланцюги та поширюватися в навколишньому середовищі через відходи тваринного походження. Вони можуть спричинити складні, важковиліковні та тривалі інфекції у людей, що призведе до збільшення витрат на медичні послуги, а іноді й до смерті.

Стійкість до антибіотиків є настільки складною та важкою через нераціональне використання антибіотиків як у клінічних, так і сільськогосподарських умовах, низький соціально-економічний статус, поганий санітарний та гігієнічний стан, а також нерегулярне культивування патогенів зоонозних інфекцій, стійкість яких до широко використовуваних антибіотиків майже не досліджується [16].

Нині зростаюча кількість штамів бактеріальних патогенів, стійких до ліків, порушує ефективність існуючих методів лікування та збільшує частоту нових бактеріальних інфекцій. Ця обставина спонукає дослідників усього світу до пошуку нових ефективних і водночас малотоксичних лікарських засобів, які відрізняються інноваційними механізмами дії. На сьогодні цей напрям має найбільше значення для фармацевтичної науки. Визначено що, триазол-3-тіоли, які можна використовувати як альтернативу протимікробним засобам, проявляють бактерицидну дію до *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O 2, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium perfringens* [51].

Використання фітопрепаратів замість хімічних синтетичних протимікробних сполук також набуває популярності. У дослідженні *in vitro* оцінено вплив фенольного вмісту, а також активність антибіоплівки щодо *Staphylococcus aureus* фенольного екстракту *Taraxacum officinale*, який зазвичай називають кульбабою і є багаторічною трав'янистою рослиною, що належить до сімейства айстрових. Вона володіє гарним антибактеріальним ефектом, який пов'язаний з фенольними речовинами. Отримані результати

показали, що кульбаба має гальмівну дію на *S. aureus*, а механізм її дії полягав у порушенні цілісності клітинної стінки [162].

Оскільки застосування протимікробних препаратів призводить до розвитку резистентності бактеріальних ізолятів, необхідно скоротити лікування антимікробними препаратами в медицині та ветеринарії загалом. Використання мікробного антагонізму у ветеринарній практиці, як альтернатива антибіотикам наразі набуває великого поширення для застосування у господарствах. В даний час терапевтичне використання бактеріофагів може бути альтернативою або доповненням до лікування бактеріальних інфекцій тварин. Так дослідниками встановлено [79], що бактеріофаги можуть бути альтернативним методом лікування бактерій, стійких до антибіотиків, у тому числі маститу у корів. У нашому дослідженні описано первинне виділення та бактеріологічну активність бактеріофагів, що циркулюють на молочних фермах, проти *S. aureus* var. *bovis*. Дослідження показали, що серед досліджених нами бактеріофагів фаг SAvB14 з коротким латентним періодом має найкращу літичну дію на культуру *S. aureus* var. *bovis*. Отриманий штам бактеріофага може бути використаний для створення препарату на основі бактеріофага для лікування корів від маститу.

Також у роботі [77] наведено результати вивчення впливу бактеріофага фага SAvB14 на мікробні біоплівки *Staphylococcus aureus* variant *bovis* як окремо, так і в комплексі з антибіотиками. Для цього використовували штам *S. aureus* var. *bovis* 1491 f та бактеріофаг Phage SAvB14, виділений на молочних фермах. Ефект від сумісного застосування фага і антибіотиків (гентаміцин, тетрациклін, цефтріазон, цефтріаксон, ефтріаксону та енрофлоксацину) оцінювали після одночасного та наступного введення Phage SAvB14 у дозі 105 одиниць на мілілітр (БУЩ/мл) та відповідних концентрацій антибіотиків до 24-годинних біоплівок. Було встановлено, що з досліджуваних антибіотиків тільки гентаміцин і цефтріазон проявляли синергічний ефект у комбінації з Phage SAvB14.

Комбіноване лікування гентаміцином і фагом зменшило кількість *S. aureus* у біоплівці в 39,81 рази порівняно з лікуванням лише фагом. Значний синергічний ефект мав і цефтриаксон – він вбивав у 1,26 рази більше бактерій у комбінації з фагом, ніж окремо. Інші антибіотики не підвищували антибіотичну активність фага.

Також науковці у своїх дослідженнях довели ефективність знищення *Escherichia coli* [166] та *Salmonella enterica* [157] за використання антимікробного пептиду мастопарану.

Варіантом вирішення проблеми заміни антибіотиків може бути біологічний метод антагонізму. У ветеринарії відома практика застосування бактеріофагів та пробіотичних мікроорганізмів [71].

Отримання якісного та безпечного коров'ячого молока – важливе завдання для молочних ферм. Більшість науковців стверджують, що мастит великої рогатої худоби спричинений переважно біологічними факторами, і тому вважають його інфекційним захворюванням молочної залози [116, 118]. Для лікування корів від маститу використовуються препарати, що містять (1) антисептики (йод, реванол та ін.), які є речовинами невибіркової дії на збудників, і (2) хіміотерапевтичні засоби, які є речовинами вибіркової дії на окремі види мікроорганізмів. До другої групи належать: сульфаніламід, антибіотики, нітрофуран та хінолони, похідні хіноксаліну та ін. [119].

Основним лікуванням маститу зазвичай є інфузія інтрамаммарної мазі або внутрішньом'язові чи внутрішньовенні ін'єкції антибіотиків, таких як стрептоміцин, ампіцилін, флоксацилін, пеніцилін і тетрациклін [36]. Однак очікується, що найближчим часом лікування стане проблематичним через швидке зростання стійких до антибіотиків збудників [76, 156]. Тому в технологію виробництва молока необхідно запровадити комплекс ефективних профілактичних заходів щодо боротьби із захворюваннями молочної залози корів, зокрема маститом.

Препарати для інтрацистернального застосування при маститах корів: мастисан А, мастисан Б, мастисан Е, мастисид [109]. Вони містять різні

комбінації антибіотиків або антибактеріальні препарати в поєднанні з сульфаніламидами.

Зазвичай масляна основа препаратів перешкоджає контакту антибіотиків зі збудниками маститу і їх проникненню в тканини вимені. При цьому близько 50 % антибіотиків у препараті виводиться з молоком, що створює екологічні проблеми та обмежує використання молока, отриманого від корів, які отримували такі препарати [146].

Найкоротший період виведення мають протимаститні препарати на основі цефалоспоринів 3 і 4 поколінь – не більше 60 год (для порівняння, препарати на основі лінкоміцину або гентаміцину виводяться за 5-7 діб), ін'єкційні препарати цефалоспоринів 3 покоління (препарати на основі цефтіофуру) не мають тривалого терміну виведення з організму [113].

«Діоксилін-гель» містить комплекс, що включає антибіотики та антисептики в низьких концентраціях. Це дає можливість ефективно боротися із запальним процесом у молочних залозах корів. Препарат являє собою полімерний гідрогель, при нанесенні на вим'я тварини швидко висихає. Плівка, що утворюється після висихання, забезпечує тривалу дію активних компонентів на запалення. Крім того, він захищає від шкідливих зовнішніх впливів. «Діоксилін-гель» не токсичний і не впливає на якість молока [57].

У медицині та ветеринарії відомо, що обліпихова олія містить вітаміни А, провітамін (каротин) 0,9–10,9 мг %, В1 (тіамін) 0,016–0,085 мг %, В2 (рибофлавін) 0,030–0,056 мг %, В3, В6, В9, К, макро- і мікроелементи, фолієва кислота 0,79 мг %, вітамін С (аскорбінова кислота) 54-316 мг %, Р (біофлавоноїди) 75-100 мг %, вітамін К (філохінони) 0,9-1,5 мг %, Е (токоферол) 8–18 мг. Обліпихова олія рекомендована для профілактики розвитку запальних процесів і має захисну дію на слизові оболонки [41].

Відомо, що спосіб лікування корів від маститу, що включає біологічно активні компоненти та розріджувальне середовище, в якому згідно винаходу Віватон 10%; АСД-2ф 4 %; «Бурсанатал» — рідкий імуномодулятор із *Fabrica*

bursa 6 %, ізотонічний розчин — 0,9 % як розріджувальне середовище [101]. Недоліком прототипу є його багатокомпонентний склад, а також складність реалізації винаходу. Virbac New Zealand Limited виробляє препарат для лікування корів від маститу під назвою Masticillin, який містить прокаїн пеніцилін. Використовується для лікування корів від маститів на початку сезону, зокрема стрептококкових. Дослідники [1] встановили, що ефірні олії з *Thymus Vulgaris* і *Lavandula Angustifolia* показали велику антибактеріальну активність проти основних штамів маститу *Staphylococcus* і *Streptococcus*. Науковці [50] проаналізували практику лікування тварин від маститу та повідомили, що 25 різних видів рослин використовуються для лікування та боротьби з маститом у корів і буйволів у Пакистані.

Дослідники [124] запропонували лікування корів від маститу, викликаного грампозитивними бактеріями, натуральними засобами, що містять різні рослинні екстракти та прополіс.

Виникнення резистентності до антимікробних препаратів через надмірне використання антибіотиків у тварин, які вирощують харчові продукти, стало серйозною проблемою [160], особливо з огляду на ризик розвитку нових резистентних бактерій, які можуть передаватися від тварин до людей [57]. Тому вкрай важливо розробити профілактичні та альтернативні плани лікування, щоб зменшити залежність від антибіотиків у молочному стаді [20]. На сьогоднішній день повідомлялося про інші форми терапії (або комбінації протимікробних препаратів) для лікування тварин від маститу з різними рівнями ефективності [38]. Бактеріюцини, такі як нізин А, продемонстрували антибактеріальну активність проти збудників маститу [109]. Імуностимулятори, такі як женьшень, а також використання сполук рослинного походження [107] і імунних білків, таких як лактоферин [117], також були протестовані в цьому відношенні. Повідомлялося, що пробіотичні штами молочнокислих бактерій усувають стафілококові біоплівки, що викликають мастит. Крім того, *Lactobacillus casei* BL23 продемонстрував протизапальні властивості на стимульованих *S. aureus* епітеліальних клітинах

молочної залози великої рогатої худоби [147]. Однак залишається багато механічних і дослідних робіт для з'ясування потенціалу пробіотиків як замінників антибіотиків. Нарешті, фагова терапія для лікування великої рогатої худоби від маститу була ускладнена через інгібування фагів сполуками, присутніми в коров'ячому молоці [37]. Однак фагові ендолізینی є перспективними антимікробними альтернативами з доведеною сильною активністю проти збудників маститу. Однак ендолізینی потребують генної інженерії як для виробництва, так і для розробки, що свідчить про те, що це ліки майбутнього.

Встановлено, що двокомпонентний бактеріоцин, який виробляє LAB *L. lactis* DPC3147, пригнічує широкий спектр збудників грампозитивних маститів [101]. Штами *Lactococcus lactis* зазвичай використовуються як молочні закваски, а численним штамам у молочній промисловості. Дослідники [153] повідомили, що лактицин 3147 у поєднанні з ущільнювачем сосків на основі вісмуту запобігає *S. dysgalactiae* інфекції у сухостійних корів та інфекції *S. aureus* у лактуючих корів. В окремому польовому дослідженні [102] оцінили бактерицидну активність ліофілізованого препарату культури, що продукує лактицин 3147, ресуспендованої в стерильній воді, і виявили, що лікування було таким же ефективним, як і звичайне лікування антибіотиками. Крім того, у цьому дослідженні було зазначено, що грамнегативний штам кишкової палички, нечутливий до лактицину 3147, також був одним із збудників маститу, які були знищені цим ліофілізованим препаратом. Таким чином, було припущено, що механізм, відмінний від виробництва бактеріоцину, сприяв елімінації цього грамнегативного патогену. Крім того, дослідники [45] повідомили, що вливання ліофілізованого *L. lactis* DPC3147 швидко стимулювало внутрішньомаммарну імунну систему хазяїна, що призводило до залучення лімфоцитів і поліморфноядерних лейкоцитів до молочної залози разом із локалізованим виробництвом білків гострої фази. Поєднання цих факторів сприяє очищенню молочної залози від збудника. В окремому дослідженні [102] повідомлялося, що занурення сосків, що містять

лактицин 3147, було ефективним для знищення збудників маститу *S. aureus*, *S. dysgalactiae* та *S. uberis* коров'ячих сосків. Однак виробництво достатньої кількості чистих антимікробних пептидів було б дорогим і є одним із основних вузьких місць, що перешкоджає використанню очищених антимікробних бактеріоцинів для лікування у великої рогатої худоби маститу. Розроблена жива біотерапевтична композиція, що містить емульсію *L. lactis* DPC3147 на основі рідкого парафіну. Цей живий біотерапевтичний препарат продемонстрував 47 % показник одужання порівняно з 50 % одужання при використанні комерційного антибіотика Terrexine™ для лікування корів із клінічним і субклінічним маститом [99].

Ефективний у часі та недорогий характер виробництва цієї живої біотерапевтичної композиції на основі емульсії в поєднанні з її подовженим терміном придатності порівняно з попередніми водними композиціями на емульсію *L. lactis* DPC3147, свідчить про те, що цей продукт може являти собою реалістичний альтернативний терапевтичний варіант для маститу великої рогатої худоби.

Основним методом профілактики захворювань вимені є науково обґрунтоване економічно ефективне розведення худоби з дотриманням зоогігієнічних норм утримання, годівлі та доїння, забезпечення високого рівня природної резистентності організму та продуктивності тварин.

1.5 Висновки з огляду літератури

Лікування дійних корів від маститу є важливим завданням для ветеринарних спеціалістів. Запобігання використанню антибіотиків для дійного стада і розробка альтернативних ефективних способів лікування ставиться як завдання перед дослідниками. Як приведено вище, мастит у корів має поліетіологічне походження. Причиною маститу може бути порушення гігієни у приміщенні для тварин та доїльного обладнання. Також

неправильно налаштований апарат для доїння корів, пошкоджена доїльна гума, пульсатори можуть бути однією з причин запалення вим'я.

Крім того, дослідженнями науковців було доведено, що порушення мікробіоти шлунково-кишкового тракту може бути причиною маститу. Мікроорганізми, які є умовно-патогенними, провокують запалення в кишечнику та потім мігрують гематологічним шляхом до вимені і призводять до запальних процесів у молочних каналах.

Також поштовхом для розвитку субклінічного маститу можуть бути інфекційні патогени такі як *S. aureus*, *S. dysgalactiae* та *S. uberis*. Запобігання передачі інфекції у доїльному залі через обладнання та навколишнє середовище є важливим ланцюгом профілактики розповсюдження маститу у стаді.

Дослідженнями науковців встановлено, що наслідком субклінічного кетозу можуть бути захворювання шлунково-кишкового тракту, порушення у опорно-руховому апараті і мастити.

Оскільки мастит має багатовекторну природу і пов'язаний з іншими системами організму, то лікування корів від маститу передбачає застосування засобу, який буде впливати на організм в цілому. В роботі запропоноване використання пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* NCH 55 в якості альтернативи антибіотику. Застосування саме цього штаму пов'язане із його властивостями та зручності у використанні в умовах господарства.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали досліджень

Дисертаційну роботу виконано в період із 2018 до 2022 рік на кафедрі акушерства та хірургії Сумського національного аграрного університету.

Виробничі дослідження проводились в умовах ТОВ «Агрофірма Лан» с. Кіндратівка, Сумського району, Сумської області; ТОВ «Комишуватський МК» с. Миколо-Комишувата, Красноградського району, Харківської області на коровах породи голштин відповідно до директиви 2010/63/ЄС [70], які затверджені висновком комісії з питань етики та біоетики факультету ветеринарної медицини Сумського національного аграрного університету.

Матеріалом для дослідження були: пробіотик *Bacillus megaterium* NCH 55, здорові тварини та корови, хворі на субклінічний мастит.

Перший етап роботи був виконаний в умовах лабораторії і присвячений дослідженню вірулентності, антагоністичної активності, біохімічних та мікробіологічних особливостей штаму *Bacillus megaterium* NCH 55.

Другий етап роботи проводився в умовах дослідних господарств, де визначали мікроклімат у приміщеннях для утримання дійного стада.

На третьому етапі роботи проводили моніторинг збудників маститу у молочних господарствах. Відбирали у господарствах ізоляти збудників маститу та проводили лабораторні дослідження, щодо визначення протимікробних властивостей *Bacillus megaterium* NCH 55.

Мікробіологічними дослідженнями встановлена ефективна бактерицидна та фунгіцидна концентрація *Bacillus megaterium* NCH 55.

Четвертий етап присвячений визначенню якості молока корів за субклінічного маститу.

Дослідження проводили за схемою яка наведена на рис. 2.1.

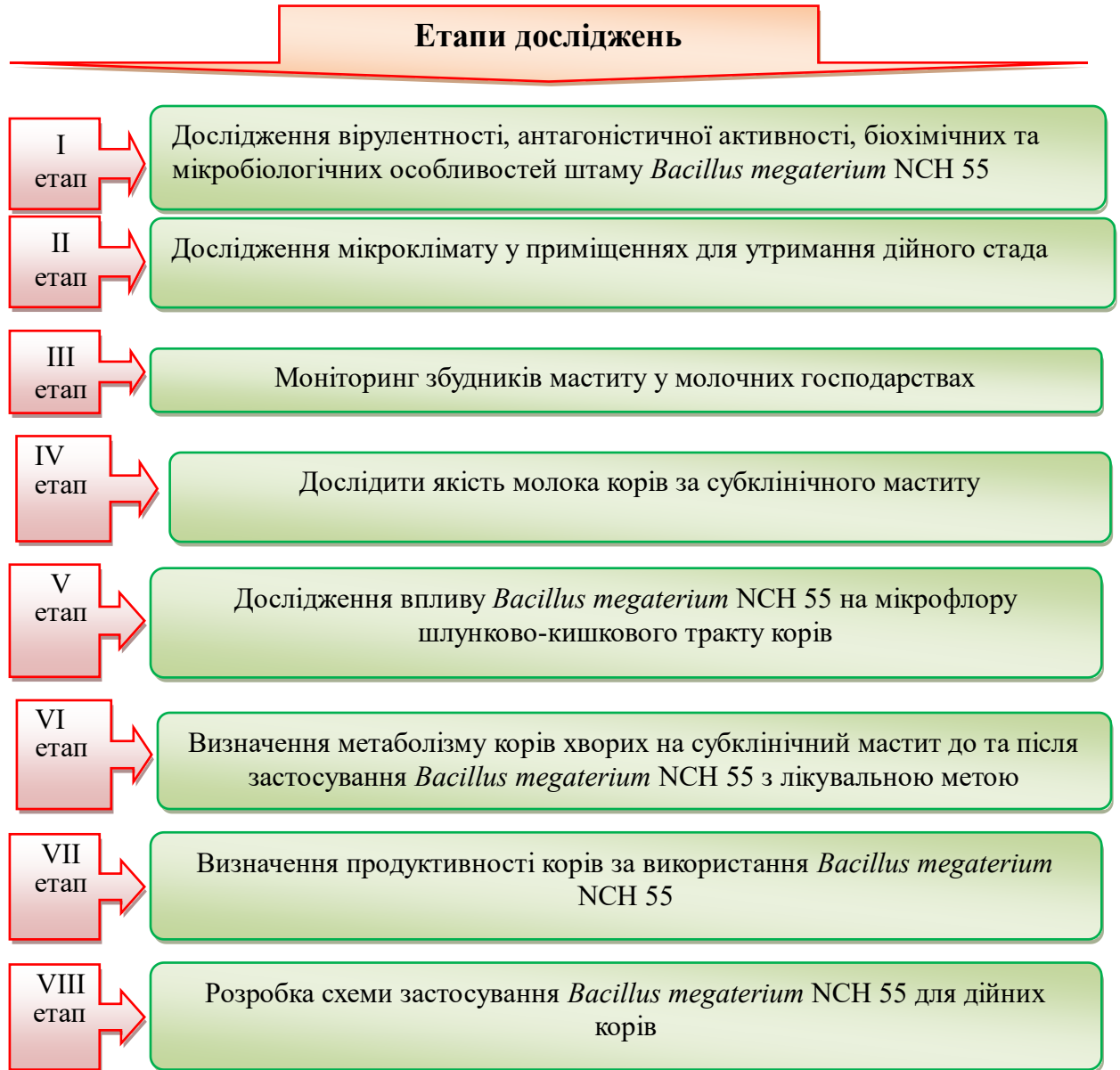


Рис.2.1. Загальна схема проведення досліджень

На **п'ятому етапі** визначали вплив *Bacillus megaterium* NCH 55 на мікрофлору шлунково-кишкового тракту корів. При цьому встановлювали зміну кількісного складу корисної та умовно-патогенної мікрофлори.

Шостиму етапом виробничих досліджень був присвячений визначенню метаболізму корів хворих на субклінічний мастит до та після

застосування *Bacillus megaterium* NCH 55з лікувальною метою.

Метою **сьомого етапу** досліджень було визначення продуктивності та якості молока корів за використання *Bacillus megaterium*. На даному етапі досліджували відновлення молочної продуктивності та повернення якості молока.

Завданням **восьмого етапу** було розробити схему застосування нового пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* NCH 55 для лікування та профілактики субклінічного маститу у корів.

2.2 Методи досліджень

Дослідження проводились у молочних господарствах України з вирощування породи голштин 1-5 лактації. Коровам хворим на субклінічний мастит дослідних груп задавали концентровані корми з додаванням *Bacillus megaterium* NCH 55 (1×10^9 КУО/г) в дозі 15-35 г на тварину.

Контрольній групі корів давали звичайний раціон для дійних корів. Експериментальних тварин розподіляли в окремі бокси після підтвердження тесту на субклінічний мастит. Зразки молока для дослідження збирали під час ранкового доїння з кожної чверті вимені у кількості 50 мл щотижня, починаючи з 7-го дня після отелення. Все дослідження проводилось відповідно до відповідних рекомендацій та норм.

Всі дослідні дії на великій рогатій худобі виконувались з урахуванням директиви 2010/63 / ЄС та уточненнями, що внесені Регламентом (ЄС) 2019/1010 та затверджені висновком комісії з питань етики та біоетики факультету ветеринарної медицини Сумського національного аграрного університету протокол № 6 від 11.10.2021 року.

Дослідження корів на субклінічний мастит. Для дослідження дійних корів на мастит використовували каліфорнійський тест [29] та мікроскопію для підрахунку кількості соматичних клітин [128].

Кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (кМАФАНМ) визначали згідно з ДСТУ 7357, ДСТУ 7089, ДСТУ ISO 4833, ДСТУ IDF 100B.

Також у молоці мікробіологічними методами визначали мікроорганізми-збудники субклінічного маститу. Спочатку 100 мкл зразка молока висівали на тріптіказо-соєвий агар з додаванням 5 % овечої крові (чашки з кров'яним агаром) і інкубували при 37 °С з 5 % вуглекислого газу: Планшети перевіряли на ріст бактерій через 24 і 48 годин інкубації.

Зразки молока з ростом трьох або більше типів колоній вважалися забрудненими під час збору викидалися і повторно збиралися. Зразки молока з двома різними колоніями вважалися змішаною інфекцією. Тип гемолізу (альфа, бета, подвійний і гамма) визначали на чашках з кров'яним агаром.

Кожну видиму колонію фарбували по Граму і диференціювали на грампозитивні або-негативні організми з морфологічної характеристикою.

Каталазний тест був проведений на грампозитивні коки для диференціації стафілококів від стрептококів.

Стафілококи є каталаза-позитивними, тоді як стрептококи є негативними до каталази. Каталаза-позитивні стафілококи були додатково диференційовані на коагулазо-позитивні та негативні за допомогою пробірних тестів на коагулазу з використанням плазми кроля та тест-смужок API Staph (США).

Каталазанегативні коки додатково оцінювали тестами API Strep (BioMerieux Inc, США). Оксидазний тест використовувався для диференціації *Enterobacteriaceae*. Оксидазонегативні *Enterobacteriaceae* додатково інокульовані в агар МакКонкі і протестовані за допомогою тест-смужок API на грамнегативні бацили (BioMerieux Inc.).

Гатунковість молока (табл.2.1) за кМАФАНМ визначали згідно з ДСТУ 7357, ДСТУ 7089, ДСТУ ISO 4833, ДСТУ IDF 100B та соматичних клітин згідно з ДСТУ ISO13366-1, ДСТУ ISO13366-2, ДСТУ 7672 [3, 4]. Крім того, були проведені молекулярно-генетичні дослідження біологічного матеріалу

(молоко) від великої рогатої худоби у полімеразно-ланцюговій реакції.

Таблиця 2.1

Гігієнічні критерії молока-сировини згідно з ДСТУ 3662:2018 Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови.

Назва показника, одиниця вимірювання	Норма для гатунків			Методи контролювання
	екстра	вищий	перший	
Кількість мезофільних аеробних факультативно-анаеробних мікроорганізмів (кМАФАнМ), тис. КУО/см ³	≤100	≤300	≤500	Згідно з ДСТУ 7357, ДСТУ 7089, ДСТУ ISO 4833, ДСТУ IDF 100B
Кількість соматичних клітин, тис/см ³	≤400	≤400	≤500	Згідно з ДСТУ ISO13366-1, ДСТУ ISO13366-2, ДСТУ 7672

Наявність можливих метаболічних зрушень в організмі корів визначали за біохімічними показниками у пробах сироваток крові (n=15), які досліджували загальноприйнятими методами спектрофотометрично (SHIMADZU UV-1800, Японія). Для визначення альбумінів використовували (СОП-БП-25-2018)З, загального протеїну (СОП-БП-02-2017), сечовини (СОП-БП-03-2017), загального холестерину (СОП-БП-07-2017), аспаратамінотрансферази (АСТ) (СОП-БП-08-2017), аланінамінотрансферази (АЛТ) (СОП-БП-09-2017), лужної фосфатази (ЛФ) (СОП-БП-04-2017). Загальні глобуліни визначали розрахунковим методом. Рівень глюкози досліджували глюкозо-оксидазним методом. Кількість

креатиніну визначали за допомогою колориметр-нефелометру фотоелектричного ФЭК – 56М, за реакцією Яффе.

Дослідження вірулентності штаму *Bacillus megaterium* NCH 55. Для експерименту використовували завись клітин у фізіологічному розчині з концентрацією 2×10^9 і 16×10^9 в 1 мл. Дослід проводили на білих мишах вагою $18,0 \pm 2$ г. Тварин адаптували два тижні до нових умов утримання [5]. Розчин клітин *Bacillus megaterium* NCH 55 вводили через зонд перорально мишам та ін'єкційно (внутрішньочеревинно). За тваринами вели спостереження після введення матеріалу протягом двох тижнів. Визначали інвазивність штаму *Bacillus megaterium* NCH 55 протягом 24 годин. Для інкубації застосовували соєво-казеїновий агар (СКА). Суспензію клітин готували на основі стерильного фізіологічного розчину, концентрацію клітин *Bacillus megaterium* NCH 55 визначали за оптичним стандартом мутності [7]. Проводили контроль фізіологічного стану та поведінки мишей. Ознакою авірулентності штаму *Bacillus megaterium* NCH 55 при введенні максимальних концентрацій спор була відсутність загибелі тварин протягом 14 діб та прояву інфекційної патології [69]

Дослідження властивостей *Bacillus megaterium* NCH55. Культивування бактерії *Bacillus megaterium* NCH55 проводили на МПА протягом 72 годин при температурі 37 °С. При цьому макроскопічним шляхом визначали колір та форму колоній. У МПБ визначали КУО/г кожні 6 годин. Активність ферментів целюлози та амілази для колоній *Bacillus megaterium* NCH55 визначали шляхом змішування 0,5 мл ферменту з 1 мл 0,05 М цитрат-фосфатного буфера рН 4,8. Після цього проводили інкубацію при температурі 50 °С протягом 1 години. Реакцію зупиняли додаванням 3 мл 3,5-динітросаліцилової кислоти. Потім розчин нагрівали до температури 100 °С 5 хвилин.

Після охолодження його центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хвилин. Дослідження проводили за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 575 нм.

Адгезивні властивості *Bacillus megaterium* NCH 55 досліджували за методом В.І. Бриліса. Визначали середній показник адгезії (СПА), коефіцієнт участі еритроцитів (КУЕ) та індекс адгезивності еритроцитів (ІАЕ) [35].

Розрахунок цих показників здійснювали за формулою (1):

$$\text{ІАЕ} = \text{СПА} \times 100 / \text{КУЕ} \quad (1)$$

Виходячи з чого отримуємо $\text{СПА} = 1,70 \pm 0,09$; $\text{КУЕ} = 84,25 \pm 2,53$; $\text{ІАЕ} = 2,00 \pm 0,11$. Бактерії не проявляють адгезивні властивості при $\text{ІАЕ} \leq 1,77$; ІАЕ від 1,77 до 2,49 – низькоадгезивні, від 2,51 до 4,0 – середньоадгезивні та $>4,0$ високоадгезивні.

Визначення антагоністичних властивостей *B. megaterium*.

Дослідження проводили методом дифузії в агарові лунки. Макроскопічним методом визначали розмір зони затримки росту за допомогою лінійки у мм навколо різного розведення культур *Bacillus megaterium* NCH 55: 1×10^5 ; 1×10^7 , та 1×10^9 , КУО/г [2].

В кожную лунку на МПА з відповідним ізолятом збудником маститу вливали відповідну концентрацію пробіотичного штаму мікроорганізму *Bacillus megaterium* NCH 55, проводили інкубацію протягом 24 годин за температури 37 °С. Після цього визначали демаркаційну зону навколо кожної лунки з різним ступенем розведення *Bacillus megaterium*.

Дослідження терапевтичного ефекту від застосування коровам хворим на субклінічний мастит *Bacillus megaterium* NCH 55. За допомогою каліфорнійського тесту виявляли корів, хворих на субклінічний мастит. Після визначення антагоністичних властивостей *Bacillus megaterium* встановлена ефективна концентрація 1×10^9 , КУО/г. Десяти хворим коровам задавали протягом 30 діб разом із концентрованими кормами *Bacillus megaterium* NCH55 у вигляді порошку (спори) у концентрації 1×10^9 , КУО/г 35 г / тварину на добу. Протягом експериментального періоду оцінювали клінічний стан тварин, продуктивність та ознаки маститу.

У молоці визначали кількість соматичних клітин та мікроорганізмів.

Вважали молоко безпечним, якщо воно відповідало вимогам класу «Екстра».

Статистичний аналіз. Для обробки отриманих даних використовували програми Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., USA) а також статистичний аналіз StatPlus 2009 professional 5.8.4 for Windows (StatSoft Inc., USA). Оцінку достовірності проводили за t-критерієм Стьюдента.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Дослідження властивостей штаму *B. megaterium* NCH 55

3.1.1 Дослідження вірулентності штаму *B. megaterium* NCH 55

Штам *Bacillus megaterium* NCH 55 надано для випробувань ПП «Кронос Агро» згідно договору № 42-2020 від 24.02.2020.

Окремі види вказаного роду включено до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей або бути для них токсичними чи алергічними чинниками. Рівень патогенності мікроорганізму базується на встановленні у гострих, субхронічних та хронічних дослідів на двох видах теплокровних лабораторних тварин ряду токсико-гігієнічних показників: вірулентності, токсичності, токсигенності, алергенності, імунотоксичної, дисбіотичної та подразнюючої дії тощо. Для депонування даного штаму визначали рівень його безпеки у гострих дослідів на моделі білих мишей за допомогою дослідження одного із показників патогенності - вірулентності бактерій.

Вірулентними вважаються штами мікроорганізмів, ЛД₅₀ яких при надходженні через шлунок менше ніж 10^8 і відповідно менше 3×10^7 при внутрішньочеревних ін'єкціях. Мікроорганізми, які мають ЛД₅₀ більше вказаних граничних величин належать до 3 або 4 класу небезпеки. Для мікроорганізмів IV класу небезпеки керувалися рекомендованими граничними мінімальними концентраціями клітин ЛД_{50в/ч} не менше 10^9 та ЛД_{50пер ос} не менше 10^{11} клітин/мишу, а для бактерій III класу небезпеки ЛД_{50в/ч} в межах $10^7 - 10^9$ та ЛД_{50пер ос} в межах $10^9 - 10^{11}$ клітин/мишу.

Інфективність (інвазивність) штаму визначали за можливих природних шляхів потрапляння їх в організм, а саме визначали здатність мікроорганізмів

проникати у тканини органів лабораторних тварин.

Мишам вводили одноразово перорально активну культуру *Bacillus megaterium* NCH 55 в максимальних дозах, що не призводять до загибелі тварин.

Через 14 діб після зараження і закінчення терміну спостережень за тваринами, їм проводили евтаназію з дислокацією шийних хребців та подальшим розтином і макроскопічне дослідженням внутрішніх органів та висівом їх зразків на живильний агар. Для контролю паралельно висівали на чашки з агаром чисту культуру штаму.

В період спостереження після внутрішньочеревного введення суспензії клітин бактерій у дозі 1 млрд. не встановлено зміни поведінкових реакцій мишей, всі тварини добре поїдали корм, змін з боку шкірного покриву не помічено. Була відсутня достовірна різниця в масі тіла дослідних і контрольних тварин. Миші були активними, фізіологічні відправлення у них не порушувались, поведінкові реакції звичайними. Клінічних ознак інфекційного ураження тварин не встановлено. Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин при висіві зразків на СКА через 14 діб після в/ч ін'єкцій не виявили ознак зараження культурою *Bacillus megaterium* NCH 55 у нирках та печінці.

Середньолетальні дози культури *Bacillus megaterium* NCH 55 при внутрішньочеревному введенні не були досягнуті, оскільки останні перевищували застосовану концентрацію. Так, ЛД₅₀ в/ч $>1 \times 10^9$ клітин/мишу (табл. 3.1).

Отримані при в/ч введенні результати свідчать про можливість приналежності штаму по ступені небезпеки мікроорганізмів до 4-го класу, а саме —маю небезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії. На 14 добу після в/ч ін'єкції 1×10^9 клітин/мишу не спостерігається носійства культури у печінці та нирках тварин.

Після пероральної затравки дози 8 млрд. клітин/мишу не встановлено загибелі дослідних тварин. Всі тварини добре поїдали корм, змін з боку

хутряного покриву не помічено.

Таблиця 3.1

Результати дослідження вірулентності штаму *Bacillus megaterium* NCH 55

Матеріал для введення	Кількість мишей	Доза		Шлях введення	Курс введення	Кількість мишей, штук		
	штук	мл	млрд. клітин		діб	захво-ріло	заги-нуло	вижи-ло
Дослід								
Суспензія 1-добової культури	10	0,5	1	в/ч	1	0	0	10
	10	0,5	8	per os	1	0	0	10
Контроль								
Фізіологічний розчин	6	0,5	0	в/ч	1	0	0	6
	6	0,5	0	per os	1	0	0	6

За результатами досліджень встановлено відсутність достовірної різниці маси тіла дослідних і контрольних тварин. Миші були активними, фізіологічні відправлення у них не порушувались, поведінкові реакції були звичайними. Клінічних ознак інфекційного ураження тварин не встановлено. Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин при висіві зразків на СКА через 14 діб після пероральної затравки не виявили носійства культури у нирках та печінці: ретрокультури при висіві зразків печінки чи нирок на СКА не виявлені.

Середньолетальна доза культури *Bacillus megaterium* NCH 55 при пероральному введенні не встановлена, так як вона перевищує застосовану дозу $LD_{50 \text{ per os}} > 8 \times 10^9$ клітин/мишу. Культура неінвазивна, оскільки не зберігається в тканинах органів тварин через 14 днів після пероральної затравки, ретрокультури відсутні.

Всі миші і контрольні в тому числі, які залишились живими після закінчення експерименту були піддані евтаназії для розтину. Під час розтину не було встановлено ознак інфекційної патології та ураження внутрішніх

органів у мишей. За результатами розтину лабораторних тварин було встановлено:

- серце має звичайну форму і розмір;
- об'єм легень не змінений, мають гладеньку поверхню, долі не мають спайок і легко відокремлюються;
- шлунок, петлі тонкого і товстого кишечника не мають зовнішніх змін, на розрізі ознаки ураження відсутні;
- розмір печінки не збільшений, колір темно-червоний, пружної консистенції, кровонаповнення середнє, поверхня гладенька блискуча, на розрізі однорідний малюнок;
- поверхня нирок гладенька, розмір не збільшений, на розрізі спостерігали чіткий малюнок з виділеними корковою та мозковою речовинами;
- консистенція селезінки туга, розмір не збільшений, на розрізі однорідний малюнок пульпи темного кольору.

Таким чином, штам *Bacillus megaterium* NCH 55 згідно отриманих у гострих дослідах результатів та відповідних нормативних матеріалів є авірулентним неінвазивним мікроорганізмом, що належить до непатогенних мікроорганізмів IV класу небезпеки: «мало небезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії». $LD_{50 \text{ пер ос}} > 8 \times 10^9$, $LD_{50 \text{ в/ч}} > 1 \times 10^9$ клітин/мишу. Мікроорганізми цього класу небезпеки дозволені МОЗ України до використання у виробництві. Дослідження проведені для депонування культури як первинна санітарно-гігієнічна оцінка штаму.

3.1.2 Визначення антагоністичної активності *Bacillus megaterium* NCH 55

Антагоністичну активність *Bacillus megaterium* NCH 55 визначали за класичним методом відтермінованого антагонізму. З цією метою вирощували колонії мікроорганізмів на 2 % МПА при температурі 37°C. Чашки Петрі з колоніями культур мікроорганізмів були оброблені протягом 50 хвилин

парами хлороформу.

Далі протягом 60 хвилин колонії підсушували під кварцевою лампою. Вирощені бульйонні культури об'ємом 0,1 мл тестових штамів мікроорганізмів змішували з 5,0 мл 0,7 % розплавленого МПА.

Дослідження отриманих результатів проводили протягом 24 годин після інкубації. Визначали навколо колонії помітну зону затримки росту, то вважали, що штам *Bacillus megaterium* NCH 55 проявив антагоністичну активність. Рівень антагоністичної активності враховували за ступенями від дуже високого (більше 36 мм), високого (27–36 мм), середнього (14–26 мм) та до низького (7–14 мм). У якості індикаторних культур використовували еталонні штами *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E. coli* K12 NCTC 10538, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger*. Результати статистично оброблялись. Після вирощування культур мікроорганізмів проводили вимірювання. Також дослідження проводили методом прямого інкубування. В умовах даного методу на чашку з 2% пластинчатим поживним агаром по центру наносили культуру *Bacillus megaterium* NCH 55 і відразу штрихами засівали культури еталонних штамів (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

**Результати визначення антагоністичної активності
Bacillus megaterium NCH 55 до еталонних штамів**

№ п/п	Еталонні штами	<i>Bacillus megaterium</i> NCH 55	
		метод відтермінованого антагонізму	метод прямого інкубування
		зона затримки росту, мм	
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	не чутлива	не чутлива
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	33,26±0,03	34,10±0,05
3	<i>E. coli</i> K12 NCTC 10538	34,13±0,02	30,42±0,04
4	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 29630	35,12±0,06	34,22±0,05
5	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	30,12±0,04	28,30±0,03
6	<i>Aspergillus niger</i>	не чутлива	не чутлива

Отримані результати абсолютних значень зон затримки росту індикаторних культур під дією *Bacillus megaterium* NCH 55 дали можливість визначити антимікробну активність стосовно тестових мікроорганізмів. Так, для всіх видів досліджуваних мікроорганізмів *B. megaterium* NCH 55 була різною

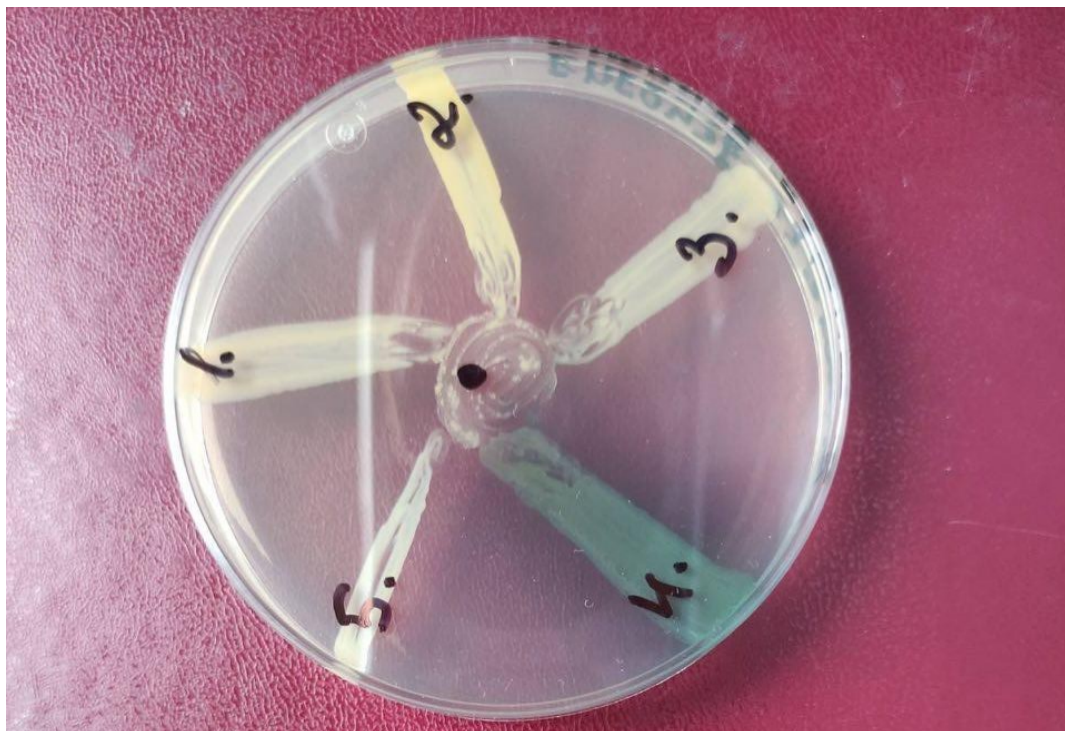


Рис.3.1 Затримка росту навколо *Bacillus megaterium* NCH 55 мікроорганізмів 1 – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, 2 – *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, 3 – *E. coli* K12 NCTC 10538, 4– *Salmonella typhimurium* ATCC 29630, 5 – *Candida albicans* ATCC 10231

За результатами проведених досліджень було встановлено, що до *Bacillus megaterium* NCH 55 не були чутливі культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 та *Candida albicans*. Інші еталонні штами мікроорганізмів проявили високу чутливість до *Bacillus megaterium* NCH 55 згідно методики проведення дослідження.

Отримані результати зменшення та затримки росту індикаторних культур під дією *Bacillus megaterium* NCH 55 дозволили проаналізувати активність відносно різних видів тестованих бактерій та грибів і визначити рівень антагоністичної активності.

Так, для всіх видів досліджених клінічних культур активність *Bacillus megaterium* NCH 55 була різною, але в основному збігається з визначенням методом відтермінованого антагонізму.

У наступному дослідженні визначали антагоністичні властивості пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* стосовно мікроорганізмів-ізолятів від корів, хворих на субклінічний мастит (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Результати визначення антагоністичних властивостей *B. megaterium* NCH 55 стосовно мікроорганізмів-ізолятів від корів, хворих на субклінічний мастит, ($M \pm m$), $n=7$

Культури мікроорганізмів, виділених із молока корів за субклінічного маститу	Розведення культури, КУО/г		
	1×10^5	1×10^7	1×10^9
	Зона затримки росту, мм		
<i>S. agalactiae</i>	$2,25 \pm 0,03$	$4,15 \pm 0,06$	$27,45 \pm 0,15^*$
<i>S. aureus</i>	$2,53 \pm 0,07$	$6,20 \pm 0,09$	$26,56 \pm 0,14^*$
<i>S. epidermidis</i>	$1,55 \pm 0,08$	$4,57 \pm 0,02$	$25,38 \pm 0,18^*$
<i>E. fecalis</i>	$1,34 \pm 0,03$	$5,83 \pm 0,07$	$26,32 \pm 0,20^*$
<i>E. coli</i>	$3,45 \pm 0,06$	$5,36 \pm 0,08$	$30,89 \pm 0,12^*$
<i>C. albicans</i>	$1,34 \pm 0,04$	$5,64 \pm 0,09$	$30,32 \pm 0,11^*$

Примітка: * - $P \leq 0,05$ порівняно з 1×10^5 , КУО/г *B. megaterium*

За результатами отриманих досліджень встановлено, що у розведенні 1×10^9 , КУО/г *B. megaterium* NCH 55 проявляв максимальні антагоністичні властивості у вигляді зони затримки росту відносно всіх вказаних мікроорганізмів. Демаркаційна зона у чашках Петрі з 1×10^9 , КУО/г *B. megaterium* NCH 55 була більше, порівняно до 1×10^5 , КУО/г навколо

S. agalactiae – 12,2 %; *S. aureus* – 10,5 %; *S. epidermidis* – 16,3 %; *E. fecalis* – 19,6 %; *E. coli* – 8,9 %; *C. albicans* – 22,62 % відповідно. Диско-дифузійний метод використовується для визначення бактерицидних властивостей, здебільшого антибіотиків.

Дослідженнями встановлено, що у розведенні 1×10^9 , КУО/г *B. megaterium* NCH 55 проявляв максимальні антагоністичні властивості у вигляді зони затримки росту відносно всіх виділених ізолятів збудників маститу.

Звичайно, правильно підібрані антибіотики, які проявили максимальну бактерицидну дію до збудників, мають велику виражену зону затримки росту. Однак, виходячи з причини безпечності, застосування пробіотичного штаму є більш рекомендованим.

3.1.3 Дослідження мікроскопічних та біохімічних властивостей штаму *B. megaterium* NCH 55

Резистентність до антибіотиків викликає велике занепокоєння у зв'язку з впливом на громадське здоров'я. Стійкі до антибіотиків бактерії, пов'язані з хворобами тваринами, можуть бути патогенними і для людини, легко передаватися через харчові ланцюги та поширюватися в навколишньому середовищі через відходи тваринного походження. Вони можуть спричинити складні, важковиліковні та тривалі інфекційні захворювання у людей, що призведе до збільшення витрат на медичні послуги, а іноді й до смерті.

Стійкість до антибіотиків є настільки складною та важкою через нераціональне використання антибіотиків як у клінічних, так і сільськогосподарських умовах, низький соціально-економічний статус, поганий санітарний та гігієнічний стан, а також нерегулярне культивування патогенів зоонозних інфекцій, стійкість яких до широко використовуваних антибіотиків майже не досліджується.

Крім того, застосування протимікробних засобів для дійних тварин несе за собою великі проблеми із безпечністю та якістю отриманої продукції. За використання антибіотиків молоко не можна використовувати в їжу людям та тваринам протягом тривалого часу, що несе за собою значні економічні збитки.

Штам *B. megaterium* має високу здатність до вироблення екзоферментів. *Bacillus megaterium* та інші представники Відомо, що рід *Bacillus* виробляє широкий спектр протимікробних засобів. Однак кожен штам *Bacillus megaterium* має вдмінності, що до ферментів та їх ативності. Тому у наступних дослідженнях ми проводили визначення властивостей штаму *B. megaterium* NCH 55.

При проведенні мікроскопічних досліджень було встановлено, що бактерії *Bacillus m* що зігнутих паличок. Вони гра 3.2).

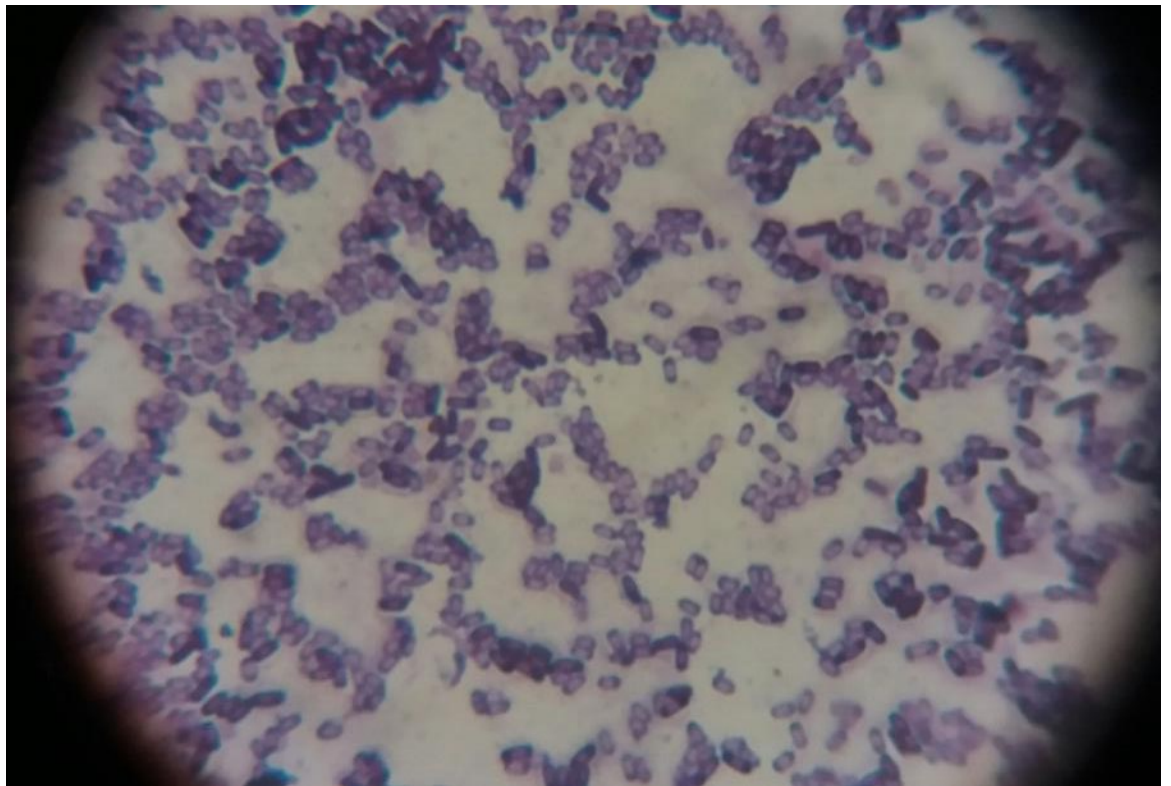


Рис.3.2 Світлова мікроскопія *B. megaterium* (збільшення $\times 4000$)

Спори витримують температуру нагрівання до +80 °С. Тваринам задаються спори мікроорганізму, які не потребують спеціальних умов зберігання. Вони добре змішуються з кормом і легко потрапляють до рубця, не втрачаючи своїх властивостей (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Біохімічні властивості *Bacillus megaterium* NCH55

Показники	<i>B. megaterium</i>
Глюкоза	+
Лактоза	+
Манітол	+
Мальтоза	+
Маноза	+
Целюлаза	+
Амілаза	+
Рамноза	-
Арабіноза	-
Сорбіт	-
Індол	-
Сечовина	+
СПА	1,70±0,09
КУЕ	84,25±2,53
ІАМ	2,00±0,11

При дослідженні властивостей *B. megaterium* NCH 55 встановлено, що бактерія використовує лактозу та глюкозу як джерело вуглецю, не розщеплює індол, рамному, арабінозу, сорбіт, але здатна утворювати сечовину.

Крім того, *Bacillus megaterium* NCH 55 виробляє ферменти мальтозу, целюлазу, манозу, амілазу, манітол.

При дослідженні адгезивних властивостей *B. megaterium* NCH 55 (рис. 3.3) доведено, що індекс адгезійності еритроцитів (ІАЕ) складав $2,00 \pm 0,11$, що відповідно до класифікації В.І. Бриліса вважається показником низької адгезії.

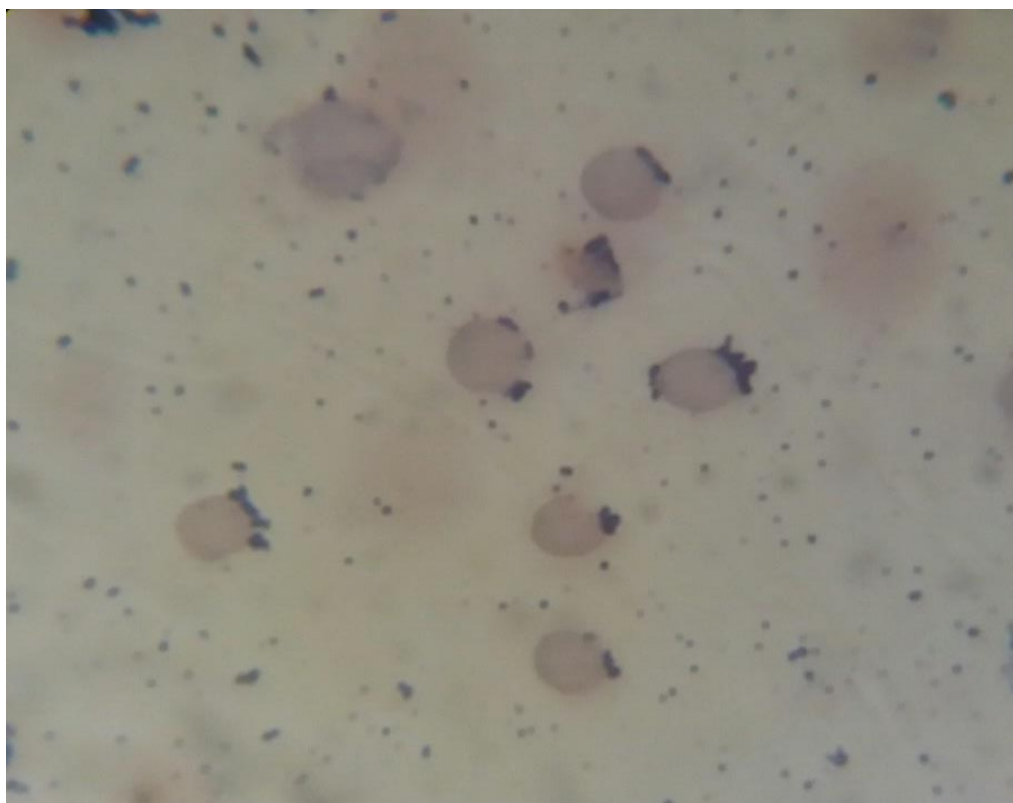


Рис.3.3 Світлова мікроскопія визначення адгезійних властивостей *B. megaterium* на еритроцитах барана (збільшення $\times 1000$)

Середній показник адгезії (СПА) був $1,70 \pm 0,09$ та коефіцієнт участі еритроцитів в адгезійному процесі (КУЕ) складав $84,25 \pm 2,53$.

Низька адгезивність *Bacillus megaterium* NCH 55 обумовлена інгібуючим ефектом продукованого ним бактеріоцину – мегацину. Це високоспецифічний антимікробний білок проти широкого спектру грамнегативних бактерій, дріжджів, грибів і грампозитивних мікроорганізмів.

Для дослідження чистоти культури *B. megaterium* NCH 55 визначали її антибіотикорезистентність (табл.3.5).

Таблиця 3.5

Аантибіотикорезистентність культури *B. megaterium* NCH 55

Назва антибіотика	Діаметр зони затримки росту, мм (разом з діаметром диску 6 мм)
канаміцин 30 мкг	27
бацитрацин 10 од	10
рифампіцин 5 мкг	20
гентаміцин 10 мкг	17
лінкоміцин 15 мкг	25
окситетрациклін 30 мкг	25
ампіцілін 10 мкг	15
стрептоміцин 10 мкг	25
хлорамфенікол 30 мкг	32
пеніцилін g 10 мкг	17
ванкоміцин 30 мкг	21
оксацилін 1 мкг	15
поліміксин в 300 од	12
фраміцетин 100 мкг	20
метіцилін 5 мкг	Не чутлива
бензилпеніцилін 6 мкг	Не чутлива

Чутливість до більшості груп антибіотиків культури *B. megaterium* NCH 55 становить загрозу при сумісному застосуванні, через відсутність вібіркової здатності протимікробних засобів знищувати тільки патогенну мікрофлору (рис. 3.4). Крім того *B. megaterium* NCH 55 виділяє власний біоцид – мегацин, який має певний спектр протимікробної активності.

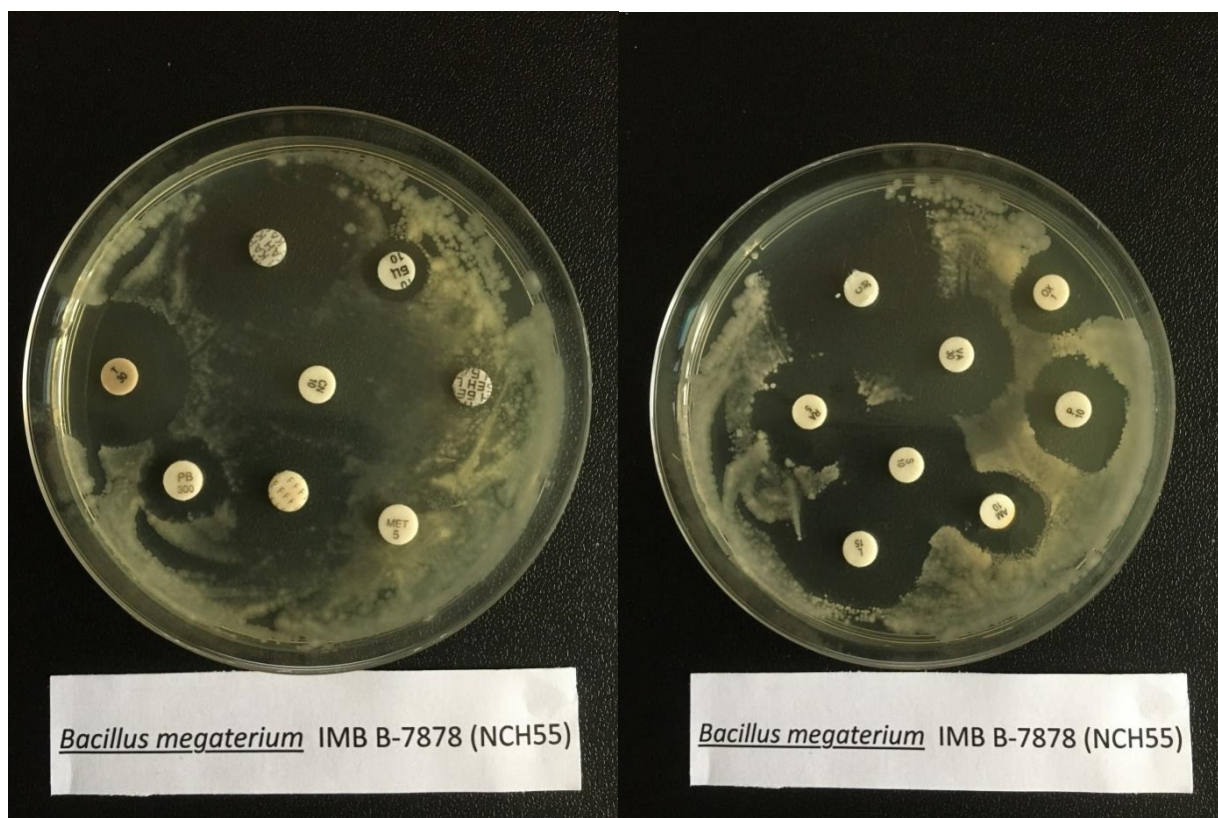


Рис. 3.4 Визначення чутливості культури *B. megaterium* NCH 55 до антимікробних засобів

В результаті проведених досліджень встановлено, що культура *B. megaterium* NCH 55 дуже чутлива до препаратів: хлорамфеніколу, фраміцетину, стрептоміцину, лінкоміцину, окситетрацикліну, канаміцину, рифампіцину, та ванкоміцину; малочутлива – до оксациліну, поліміксину, пеніциліну, бацитрацину, гентаміцину, ампіциліну; не чутлива – до метіциліну та бензилпеніциліну.

Отримані результати проведеного дослідження вказують на широкий спектр чутливості *B. megaterium* NCH 55 до антимікробних засобів, що вказує на чистоту культури та відсутність резистентності до більшості випробуваних протимікробних препаратів.

3.2 Дослідження мікроклімату у приміщеннях для утримання дійного стада

Одним з факторів, що сприяють виникненню маститу у корів на молочних фермах є недотримання норм утримання тварин. Порушення мікроклімату у приміщенні спричинює зниження резистентності організму, а підвищений рівень мікробного забруднення до виникнення захворювань. У холодну пору року дуже важливо підтримувати оптимальний температурний режим та вологість у приміщенні. Переохолодження тварин, які знаходяться у лежачому положенні на холодних сирих настилах на підлозі, призводить до запальних процесів у сечостатевої системі та молочній залозі корів. При цьому також додатковим джерелом зараження може бути висока мікробна контамінація приміщень.

У більшості досліджень мікробного забруднення повітря на тваринницьких фермах кількісно визначені концентрації всіх ізольованих бактерій або грибів, але також важливі якісні дані щодо конкретних мікроорганізмів у тваринницьких приміщеннях. Ідентифікація мікроорганізмів в умовах господарства буде корисна для вироблення стратегії профілактики та лікування захворювань, оскільки інформація про переважаючі зоонозні мікроорганізми, що переносяться повітрям, або основні бактеріальні джерела ендотоксинів може сприяти правильному аналізу факторів ризику для фермерів і тварин. Таким чином, моніторинг мікробіологічної якості повітря всередині тваринницьких ферм є важливим для забезпечення гарної якості повітря не тільки всередині приміщень ферм, а й на відкритому повітрі. Якість мікробного повітря у різних господарствах може відрізнятися через різницю в щільності посадки, гігієни корівника тощо.

При проведенні досліджень визначали параметри мікроклімату у порівнянні із нормативними показниками згідно ВНТП АПК-01.05 (скотарські підприємства) (табл.3.6).

Таблиця 3.6

**Показники мікроклімату у приміщенні для дійних корів
($M \pm m$, $n=10$)**

Пора року	Параметри мікроклімату						
	температура, °C	відносна вологість, %	бактеріальна забрудненість, тис. КУО/м ³	швидкість руху повітря, м/с	аміак, мг/м ³	вуглекислий газ, %	сірководень, мг/м ³
Норма	8–16	70–75	70–120	0,5–1	до 20	до 0,25	до 10
Осінь	10,36 ±0,34	73,52 ±0,45	130,43* ±4,72	0,36 ±0,04	18,65 ±1,12	0,18 ±0,003	8,54 ±1,10
Зима	9,40 ±0,27	87,27* ±1,34	150,26* ±4,90	0,30 ±0,02	20,45 ±0,32	0,22 ±0,002	9,62 ±1,06
Весна	15,16 ±0,56	75,42 ±1,78	137,54* ±3,47	0,42 ±0,05	17,45 ±0,53	0,24 ±0,004	9,32 ±0,35
Літо	22,10 ±0,28	70,12 ±0,34	82,37 ±0,45	0,68 ±0,07	12,78 ±0,36	0,20 ±0,002	5,47 ±0,22

Примітка.* – $P \leq 0,05$ порівняно з нормою.

За результатами проведеного дослідження визначено, що такі параметри як температура у приміщенні, швидкість руху повітря, вміст газів були у межах нормативних показників для вирощування дійного стада великої рогатої худоби. Хвилюють такі показники як відносна вологість та бактеріальне забруднення приміщення. Через відсутність примусової вентиляції у тваринницькому приміщенні взимку відносна вологість перевищує максимально допустиму межу на 16,36 %. Підвищена вологість у приміщенні збільшує тепловіддачу у тварин, ускладнює дихання.

Також волога сприяє росту мікроорганізмів, особливо мікроскопічних

грибів. Крім того, мікрочасточки води, що переносяться із повітрям сприяють розповсюдженню мікроорганізмів.

Під час визначення параметрів мікроклімату у приміщенні встановлено збільшення бактеріальної забрудненості протягом всього дослідного періоду. Показник мікробної забрудненості перевищував допустимі межі восени – на 8,69 %, взимку – на 25,21 % та навесні на 14,61 %. Провідними фахівцями ветеринарної медицини доведено, що збільшення мікробного показника у приміщенні для утримання дійного стада створює загрозу виникнення маститу. Порушення умов утримання тварин та недотримання санітарних норм сприяє створенню умов для виникнення мікробного маститу. Для визначення зазначених ризиків у подальших дослідженнях проводили моніторинг різних форм та збудників маститу.

3.3 Моніторинг збудників маститу у господарствах

Мастит, спричинений інфекційними збудниками, досі вважається згубним для молочних тварин, впливає на їх добробут, а також несе економічно величезні збитки молочній галузі через зниження продуктивності та збільшення вибракування. Мастит великої рогатої худоби – це запалення молочних залоз (вимені) великої рогатої худоби в більшості випадків спричинене бактеріальними збудниками. Дослідження проводили на фермах молочного спрямування, порода корів – голштин. Тварин утримували у вільних стійлах. Доїння відбувалось тричі на день.

Досліди проводили на коровах у 1-5 лактації. Експериментальних тварин розподіляли в окремі бокси після підтвердження тесту на субклінічний мастит. Зразки молока для дослідження збирали під час ранкового доїння з кожної чверті вимені у кількості 50 мл щотижня, починаючи з 7-го дня після отелення (табл.3.7).

В результаті проведених досліджень з'ясовано, що субклінічні форми

мастити у молочних господарства виявляються набагато частіше, ніж клінічні.

Таблиця 3.7

Поширеність захворювань корів на мастит у молочних господарствах за період 2018–2021 роки

Господарства	Кількість хворих тварин на мастит (%)	
	клінічна форма	субклінічна форма
Сумський район	23,5	56,9
Лебединський район	18,7	36,5
Конотопський район	36,3	81,7
Шосткінський район	25,4	68,2
Роменський район	22,3	56,6
Охтирський район	21,5	43,4

Так на молочно-товарних фермах субклінічна форма маститу діагностувалась частіше у Сумському районі на 33,4 %; у Лебединському – на 17,8 %; у Конотопському – 45,4 %; у Шосткінському – 42,8 %; у Роменському – 34,3 %; у Охтирському – 21,9 %, ніж клінічна. Отримані результати обумовлені санітарними умовами утримання корів, технологією доїння та періодом лактації.

Звичайна діагностика ґрунтується на розпізнаванні клінічної та субклінічної форм захворювання. Це підкреслює важливість ранньої та швидкої діагностики етіологічних агентів на рівні ферми, для якої розроблено декілька діагностичних методик. Своєчасна діагностика та терапія субклінічного маститу у тварин в господарствах зменшує ризик поширення цього захворювання.

Також важливим показником у молоці є кількісний та видовий склад мікроорганізмів, що сприяють розвитку запальних процесів у вимені корів. У господарствах Сумської області при відборі проб молока також були виділені

та ідентифіковані мікроорганізми, які і є основними збудниками субклінічного маститу корів (рис.3.5).



Рис.3.5 Видовий склад мікроорганізмів за субклінічного маститу у корів

В результаті проведених досліджень з'ясовано, що субклінічні форми маститу у молочних господарствах виявляються набагато частіше, ніж клінічні.

Господарства практикують лікувати клінічні прояви маститу. Однак не звертають належної уваги на субклінічні форми маститу, які згодом можуть переходити у хронічну стадію запалення. Отримані результати обумовлені санітарними умовами утримання корів, технологією доїння та періодом лактації.

За результатами визначення основного складу мікрофлори у молоці

корів встановлено, що основними збудниками субклінічного маститу є *S. agalactiae* (20 %), *S. aureus* (17 %), *S. epidermidis* (15 %), *E. fecalis* (12 %), *E. coli* (10 %), *Mycoplasma spp.* (8 %), гриби *Candida* (7 %) та асоційована мікрофлора (11 %).

При дослідженні маститів різної форми у корів в господарствах Сумської області встановлено, що субклінічна форма маститу діагностувалась частіше ніж клінічна у Сумському районі на 33,4 %; у Лебединському –17,8 %; у Конотопському –45,4 %; у Шосткінському –42,8 %; у Роменському –34,3 %; у Охтирському – 21,9 %. Також було визначено, що пік розвитку субклінічного маститу приходить на 7-10 добу запалення і повертається до початкових значень за два тижні.

За результатами визначення основного складу мікрофлори у молоці корів встановлено, що основними збудниками субклінічного маститу є *S. agalactiae* (20 %), *S. aureus* (17 %), *S. epidermidis* (15 %), *E. fecalis* (12 %), *E. coli* (10 %), *Mycoplasma spp.* (8 %), гриби *Candida* (7 %) та асоційована мікрофлора (11 %).

Наступні дослідження передбачають визначення патологічних змін у молоці, які виникають за субклінічного маститу у корів.

3.4 Дослідження якості молока корів за субклінічного мастит

Захворювання корів на субклінічний мастит контролювали за кількістю соматичних клітин (КСК) у молоці. Найчастіше тварини уражуються на субклінічний мастит (СМ) у перші місяці після отелу через виникнення фізіологічного стресу. Захворювання поступово зменшуються під кінець періоду лактації і знову виникає рецидив в період запуску.

Імунна реакція на запалення молочної залози має велике значення для здоров'я лактуючої корови. Збільшення кількості соматичних клітин у молоці відбувається внаслідок міграції поліморфноядерних клітин із кровоносних

судин до молочної залози в результаті вироблення медіаторів запалення. Цей механізм можна порівняти з тваринами з субклінічним маститом, що призводить до зниження репродуктивної здатності.

Вважається, що субклінічний мастит є більш економічно значущим, ніж симптоматичний мастит. Субклінічний мастит важче визначити і призводить до збільшення втрат продукції.

Однак у здорових корів кількість соматичних клітин в молоці може коливатись протягом всього періоду лактації в межах фізіологічної норми. У хворих тварин КСК різко збільшується і може переводити запалення з субклінічної форми у клінічну через відсутність своєчасного лікування (табл.3.8).

Таблиця 3.8

**Кількість соматичних клітин у молоці корів за субклінічного маститу
($M \pm m$, $n = 10$)**

Лактація	Кількість соматичних клітин в молоці, тис/см ³				
	контроль (не уражені тварини)	Період захворювання тварин (доба)			
		початок	7	10	15
1	75,3 ±4,3	8234,3* ±123,5	15432,7* ±116,5	20012,4* ±275,0	9634,4* ±132,2
2	80,5 ±4,2	9672,8* ±129,2	17236,6* ±118,8	23412,4* ±156,2	10453,6* ±120,3
3	78,5 ±3,5	10032,3* ±145,0	14784,3* ±123,5	25345,2* ±135,5	11234,5* ±164,3
4	79,5 ±4,5	9340,5* ±136,2	14355,2* ±128,7	21138,2* ±175,6	9543,9* ±112,5
5	82,6 ±4,5	10006,5* ±153,6	16322,8* ±145,3	23546,8* ±175,1	11456,4* ±128,7

Примітка.* – $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

За результатами проведених досліджень встановлено, що в першу лактацію у корів спостерігали збільшення кількості соматичних клітин в молоці на сьому добу захворювання на 87,4 %; десяту – 143,0%; п'ятнадцяту – 17,0 %, порівняно до початку хвороби.

У корів другої лактації також прослідковується тенденція збільшення запалення вим'я, на що вказує КСК, на сьому добу на 78,2 %; десяту – 142 %; п'ятнадцяту – 8,0 %.

Крім того, можна зазначити, що найбільший рецидив захворювання на субклінічний мастит приходить з сьомої по десяту добу. На п'ятнадцяту добу захворювання запалення дещо зменшується, на що вказує рівень соматичних клітин в молоці корів.

Так у корів третьої лактації на сьому добу спостерігали збільшення КСК на 47.3%; десяту – 152,6 %; п'ятнадцяту – 11,9 %, порівняно з початком захворювання.

Дослідження кількості соматичних клітин в молоці корів дає можливість визначати фізіологічний стан вим'я та початок розвитку запальних процесів. Однак показник кількості соматичних клітин необхідно визначати у кожній чверті молочної залози окремо, тому що запалення може виникати в кожній долі окремо.

На початку розвитку субклінічного маститу локалізація запального процесу в ураженій долі вимені дає можливість запобігти розвитку хвороби в здорових чвертях молочної залози.

У корів четвертої лактації хворих на субклінічну форму кількість соматичних клітин в молоці збільшується на сьому добу захворювання на 53,6 %; десяту – 126,3 %; п'ятнадцяту – 2,2 %.

За виробничими даними корови можуть хворіти на субклінічний мастит тривалий час і без ефективного лікування переходити у хронічну форму запалення, що в свою чергу призводить до виникнення гіпо- та агалактії у тварин.

У тварин п'ятої лактації відбувається підвищення показника КСК у

ураженій долі вимені на сьому добу на 63,1 %; десяту –135,3 %; п'ятнадцяту –14,4 %, в порівнянні з початком захворювання.

Як правило, субклінічний мастит у корів під час отелення переважно спричинений головними патогенами, а саме коагулазонегативними стафілококами, що спричинює запалення вимені. На початку лактації на впливають багато факторів, включаючи природу захворювання, вірулентність збудника, сухостійний період, стійкість інфекції, імунітет тварини, термін вагітності та умови утримання.

Короткочасне передпологове лікування антибіотиками є ефективним заходом для боротьби з маститом корів, але воно не часто рекомендується через тривалий несприятливий вплив на здоров'я вимені та виробництво молока, тим самим знижуючи прибуток фермерів.

Також дослідженнями було доведено, що захворювання корів на субклінічний мастит можна визначати за кількістю соматичних клітин (КСК) у молоці. Пік захворюваності припадає на перший місяць лактації. При цьому в першу лактацію у корів спостерігали збільшення КСК на сьому добу захворювання на 87,4 %; десяту –143,0 %; п'ятнадцяту – 17,0 %, порівняно до початку хвороби. У корів другої лактації також прослідковується тенденція збільшення запалення вим'я на сьому добу на 78,2 %; десяту –142,0 %; п'ятнадцяту – 8,0 %, відповідно, на що вказує КСК. Крім того, можна зазначити, що найбільший рецидив захворювання на субклінічний мастит приходить з сьомої по десяту добу.

На п'ятнадцяту добу захворювання запалення дещо зменшується, на що вказує рівень соматичних клітин в молоці корів. Так при дослідженні корів з першої по п'яту лактації отримували подібний патогенез захворювання, не залежно від лактації. Однак захворювання поступово зменшуються під кінець періоду лактації і знову виникає рецидив в період запуску. Однак у здорових корів кількість соматичних клітин в молоці може коливатись протягом всього періоду лактації в межах фізіологічної норми. У хворих тварин КСК різко збільшується і може переходити мастит з субклінічної форми у клінічну через

відсутність своєчасного лікування.

Мастит може бути епідеміологічно класифікований на заразний та не заразний, викликаний широким спектром патогенів. Крім цього, мастит також можна класифікувати як клінічний так і субклінічний.

Будь-яке підвищення рівня вологость та запиленість приміщення також збільшує навантаження бактеріальних збудників у повітрі. Виробничі дослідження показують поширеність маститу на рівні стада 74,7 %, а на рівні корів - 62,6 %. Що стосується субклінічного та клінічного маститу, перший тип, як видається, відповідальний за більшість випадків (59,2 %), ніж другий (3,4 %). Клінічний мастит можна легко ідентифікувати на основі видимих симптомів з точки зору запалення вимені, що показує почервоніння в ураженій частині, підвищення місцевої температури, набряк, біль при дотику, згустки у молоці, зміна кольору та консистенції молока. Загальними симптомами є гарячка та втрата апетиту.

Порівняно з клінічною формою, ніяких клінічно видимих симптомів при субклінічному маститі не спостерігається, хоча зміна складу молока може бути показником. Отже, це визнається та підтверджується лабораторним дослідженням молока, такими як каліфорнійський тест на мастит з подальшим виділенням збудника.

Кількість соматичних клітин (КСК) у молоці повинна бути менше 200000 на мл у здорової корови. Соматичні клітини - це переважно лейкоцити, тобто інфільтровані нейтрофіли, а також макрофаги в тканину молочної залози через запалення. *S. agalactiae* в основному локалізується у вимені та викликає стійкі інфекції з вищим КСК.

Діагностика маститу є основною вимогою молочної галузі до чистого виробництва молока не тільки з економічних причин та з точки зору громадського здоров'я, але й щодо добробуту тварин. Діагностика повинна бути ранньою, швидкою та точною для запобігання маститу або раннього виявлення захворювання для лікування або терапевтичних цілей. Це передбачає застосування звичайних, а також вдосконалених діагностичних

тестів. Звичайні методи відносно дешеві, легкі, доступні та застосовуються на місці, але зазвичай неточні. Розширені тести є дорогими, вимагають технічних навичок та складної інфраструктури та обладнання, але, як правило, точні та специфічні для різних форм.

Вибракування та чітко визначені протоколи біозахисту є ефективними заходами для контролю та запобігання повторному зараженню тварин вірулентними штамами *S. agalactiae* та *S. aureus*. Крім того, поєднання лікування антибіотиками та вибракування корів, що не реагували на протимікробні засоби, продемонструвало зниження швидкості передачі та зменшення проявів субклінічного маститу.

Для лікування корів від маститу доступні кілька режимів звичайних та вдосконалених терапевтичних заходів, які включають антибіотики, вакцинацію, терапію на основі наночастинок, трав'яну терапію та бактеріоцини. Різні агенти сприяють зменшенню інфекцій вимені, особливо маститу у корів, а також сприяють поліпшенню якості молока.

Серед них антибіотикотерапія та вакцинація є частими методами лікування корів від маститу. Широке та неконтрольоване використання антибіотиків для лікування поряд із індукцією та збереженням стійкості до антибіотиків при маститі призвело до зменшення реакції на них.

Хоча вакцинація мало ефективна проти маститу великої рогатої худоби, оскільки до її розвитку беруть участь різноманітні мікроорганізми; тим не менш, *S. aureus*, *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) та *E. coli* вважалися основними збудниками для створення вакцин. Незважаючи на те, що доступні декілька вакцин, більшість з яких не продемонстрували достатнього захисту і водночас є дорогими.

Через ці недоліки антибіотиків та вакцин з'явилося кілька інших способів терапії, які можуть заповнити пробіли. Технологія використання пробіотичних штамів мікроорганізмів є перспективними для профілактики та лікування субклінічних форм маститу.

Згідно проведених досліджень було встановлено, що кМАФАНМ

корелюється із кількістю соматичних клітин в молоці, що вказує на ступінь запалення молочної залози. Крім того, можна встановити гатунок молока та безпечність (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

**Результати дослідження молока на загальне бактеріальне забруднення,
($M \pm m$, $n = 10$)**

Дослідний матеріал	кМАФАНМ, 10^3 КУО/см ³	Кількість соматичних клітин в молоці, тис/см ³	Патогенна мікрофлора
I	$71 \pm 1,45$	$1024,5^* \pm 115,3$	<i>Mycoplasma spp</i>
II	$64 \pm 1,36$	$832,6^* \pm 111,7$	<i>S.aureus</i>
III	$67 \pm 1,28$	$906,3^* \pm 104,0$	<i>E. coli</i>
Контроль	$54 \pm 1,23$	$75,3 \pm 4,3$	-

Примітка: – $P \leq 0,05$ порівняно з контролем. Згідно ДСТУ 7357:2013 «Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання»

Дослідженнями встановлено, що кількість соматичних клітин (КСК) у молоці корів 1 дослідної групи було більше на 65 %, кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (кМАФАНМ) було більше на 31 %, порівняно до здорових тварин у контролі. Також у корів першої дослідної групи шляхом проведення ПЛР у молоці була виявлена *Mycoplasma spp*. У другій дослідній групі, де був виділений *S.aureus* у молоці, КСК було вище на 18,5 % та кМАФАНМ – на 80 %. У корів 3 дослідної групи основний патоген у молоці був виділений *E. coli*. При цьому КСК було вище на 24 %, а кМАФАНМ – на 98 %, порівняно до здорових тварин.

Мікоплазма може викликати ряд захворювань у великої рогатої худоби, включаючи мастит, артрит, пневмонію, середній отит та репродуктивні розлади. Клінічний мікоплазмійний мастит часто характеризується множинними ураженими чвертями, що супроводжуються несприйнятливістю до лікування. Дорослі тварини та телята також можуть бути вражені артритом та пневмоніями, тоді як середній отит зазвичай спостерігається лише у молодняку. Усі ці клінічні прояви можуть спостерігатися одночасно з мікоплазмійним маститом у стаді.

Мікоплазма також пов'язана з репродуктивними розладами (вильовогаїт, безпліддя, ендометрит, дистонія), проте ці прояви повідомляються менш послідовно. Надзвичайно заразний характер деяких *Mycoplasma spp.*, їх погана чутливість до лікування та пов'язані з цим наслідки вилучення для уражених тварин роблять швидку та точну діагностику важливою для контролю та запобігання спалахам захворювань.

У зв'язку з тим, що були встановлені патогенні мікроорганізми у молоці корів, проведені дослідження по встановленню чутливості мікрофлори до антибактеріальних препаратів (табл. 3.10).

За результатами проведених досліджень встановлено, що виділені ізоляти мікроорганізмів проявляли чутливість до препаратів групи пеніцилінових – клоксациліну. Також проявлялась чутливість до групи аміноглікозидів – гентаміцин, канаміцин та неоміцин. Крім того, бактерицидні властивості проявляють левоміцетин (хлорамфенікол), цефтіофур та цефалексин відносно *S.aureus*.

Результати цього дослідження підкреслюють тенденцію *Mycoplasma spp.* викликати значні зміни в складі молока в порівнянні з будь-якими іншими збудниками маститу, такими як *S.aureus* та *E. coli*. Можна пояснити збільшення кількості соматичних клітин на 18,5 % та кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів на 31 %, як доказу патогенності *Mycoplasma*, що і може бути відображенням пізньої стадії захворювання.

Таблиця 3.10

Чутливість виділеної з молока мікрофлори до антибактеріальних препаратів

Антибіотики (вказані назви діючих речовин)		Чутливість ізолятів <i>Staphylococcus spp.</i>
<i>Пеніциліни</i>	Ампіцилін	-
	Амоксицилін	-
	Амоксицилін+клавулонова кислота	-
	Клоксацилін	+
<i>Аміноглікозиди</i>	Гентаміцин	+
	Стрептоміцин	-
	Канаміцин	+
	Неоміцин	+
	Спектиноміцин	-
<i>Макроліди</i>	Тілозин	-
	Азитроміцин	-
	Спіраміцин	-
<i>Похідні хінолону</i>	Енрофлоксацин	±
	Норфлоксацин	±
	Гатифлоксацин	±
	Ципрофлоксацин	±
	Левовфлоксацин	±
	Марбофлоксацин	±
<i>Різні групи</i>	Окситетрациклін	+
	Лінкоміцин	-
	Левоміцетин (Хлорамфенікол)	+
	Поліміксин	-
	Ко-Тримаксазол	-
	Триметоприм	-
	Цефтіофур	+
	Цефалексин	+
	Новобіоцин	-

Примітка: «+» - ізолят чутливий до антибіотику, «±» - помірно чутливий, «-» - ізолят не чутливий

Часто вважається, що механізм зміни молока пов'язаний з серйозністю патогенного мікроорганізму, часткою уражених альвеол молочних залоз, порушенням кровопостачання або гормональним харчуванням цих альвеол,

порушенням цілісності епітелію і розкладанням молока через активність ферментів.

У всьому світі повідомлялося, що *Mycoplasma spp.* є основним заразним збудником мікоплазменного маститу великої рогатої худоби. У нашому дослідженні корови, інфіковані тільки *Mycoplasma spp.* (І дослідна група), не показали значного впливу на склад молока, крім кількості соматичних клітин. Корови першої групи могли перебувати на ранній стадії захворювання. Крім того, необхідно враховувати обмежений розмір вибірки першої групи ($n = 10$). Однак вплив *Mycoplasma spp.* був достатнім для запалення вимені. Незважаючи на те, що деякі дослідження вказують на можливість того, що *S.aureus* та *E. coli* можуть бути причиною маститу.

Отримані результати експерименту не показали впливу на склад молока як на окремий патоген. В дослідженні розглядали підвищений рівень кількості соматичних клітин і підвищення кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів в молоці уражених корів як вирішальний фактор, що підтверджує внесок мікоплазми в мастит великої рогатої худоби.

Соматичні клітини в основному включають макрофаги, лімфоцити, поліморфноядерні і епітеліальні клітини. Підвищення рівня цих клітин в коров'ячому молоці відображає можливість інфекції і є стандартним методом розрізнення здорових корів та хворих. Збільшення кількості соматичних клітин, мабуть, є імунною відповіддю на мастит, викликаний *Mycoplasma*, часто супроводжуваний спонтанним одужанням.

Так за результатами проведених досліджень встановлено, що у другій дослідній групі, де був виділений *S.aureus* у молоці, кількість соматичних клітин було вище на 18,5 % та кМАФАНМ – на 80 %. У корів третьої дослідної групи була виділена *E. coli*. При цьому КСК було вище на 24 %, а кМАФАНМ – на 98 %, порівняно до здорових тварин. Згідно ДСТУ 7357:2013 допустимий межа КСК у окремої корови в сирому молоці встановлено на рівні 250 тис. /см³.

Хронічний мастит є наслідком здатності *Mycoplasma spp.* утворювати множинні мікроабсцеси в інфікованій молочній залозі. Основна мета цього дослідження полягала у в відборі і моніторингу ізолятів для дослідження. Крім того, результати дослідження мають підвищити обізнаність про важливість мікоплазменного маститу для молочної промисловості. Щоб встановити поширеність цього захворювання в Україні, необхідні подальші спроби дослідження серед ураженого поголів'я з використанням методології, описаної в цьому дослідженні.

Визначено, що одним з патогенів, який викликав мастит у корів є *Mycoplasma spp.* Дослідженнями встановлено, що кількість соматичних клітин (КСК) позитивно корелюється із патогенністю збудника маститу та кМАФАНМ. Також доведено, що виділені ізоляти мікроорганізмів (*Mycoplasma spp.*, *Staphylococcus spp.* та *E. coli*) проявляли чутливість до пеніцилінових, аміноглікозидів та цефалоспоринофих груп антибактеріальних препаратів.

3.5 Вплив *Bacillus megaterium* на мікрофлору шлунково-кишкового тракту корів

У господарстві проблема субклінічного маститу виникає одразу після отелення. За результатами обстеження хворих на субклінічний мастит корів встановлено, що у них спостерігаються також ознаки гіпотонії рубця, діареї та початок розвитку кетозу. У зв'язку з цим вирішено провести експериментальне лікування молочних корів із використанням *Bacillus megaterium* у різних пропорціях разом із стандартним раціоном для дійних корів.

Результати впливу *Bacillus megaterium* на мікрофлору шлунково-кишкового тракту корів представлені у рис. 3.6.

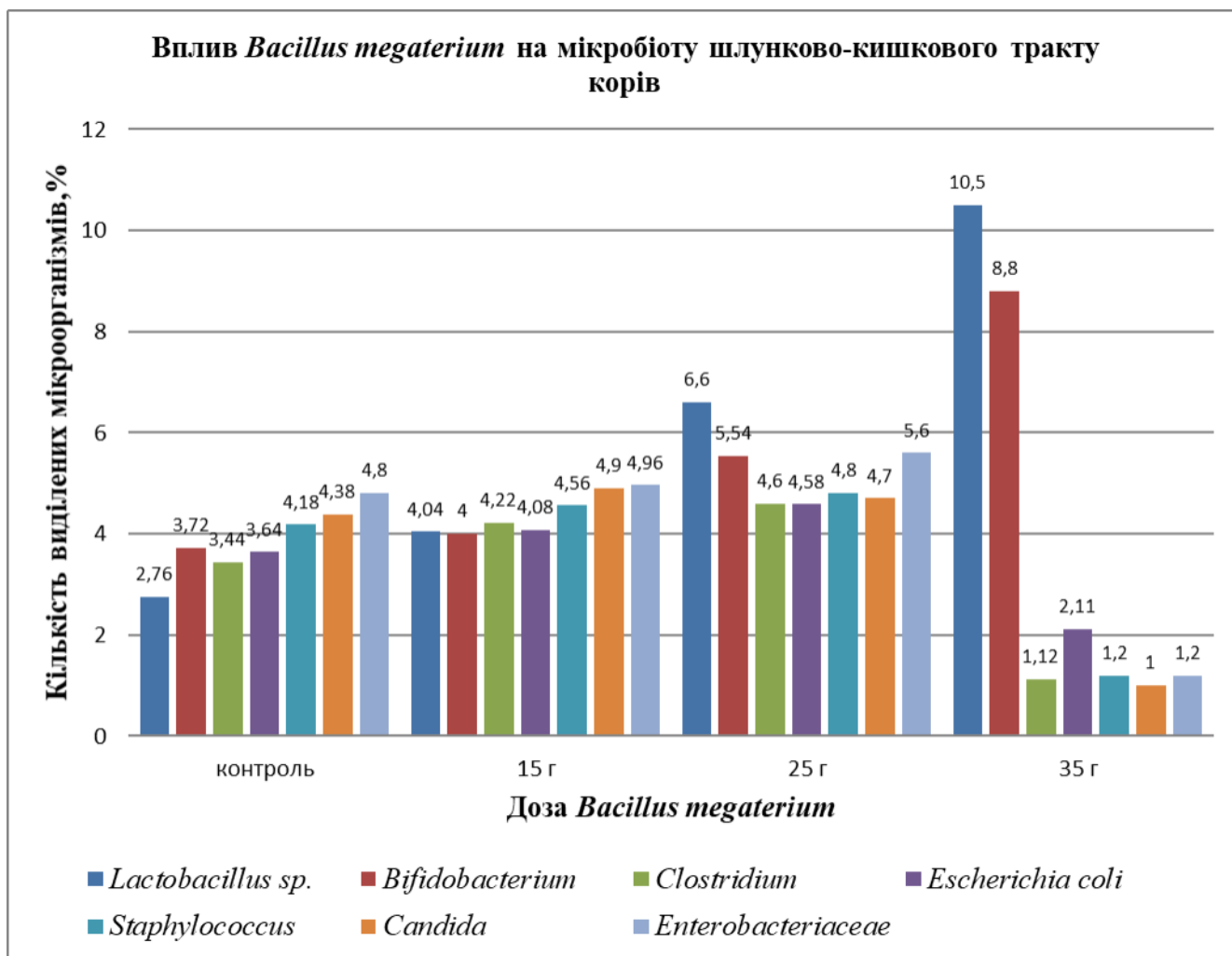


Рис. 3.6 Вплив *Bacillus megaterium* на формування мікрофлори шлунково-кишкового тракту корів.

В дозі 15 г *Bacillus megaterium* (1×10^9 КУО/г) сприяв збільшенню кількості *Lactobacillus sp.* на 10 % та *Bifidobacterium* на 12 % порівняно до контролю. Відбувалось не значне пригнічення умовно-патогенної мікрофлори.

Збільшення дози *Bacillus megaterium* (1×10^9 КУО/г) до 25 г на тварину мало позитивний вплив на мікробіоту шлунково-кишкового тракту.

При цьому рівень корисної мікрофлори збільшувалось *Lactobacillus sp.* на 35 % та *Bifidobacterium* – 30 % порівняно до контролю. Пригнічення умовно-патогенної мікрофлори відбувалось достатньо повільно.

За результатами проведеного дослідження визначено, що максимальний позитивний виражений ефект на мікрофлору шлунково-кишкового тракту корів мало використання *Bacillus megaterium* (1×10^9 КУО/г) в дозі 35 г на тварину. При цьому кількість *Lactobacillus sp.* була більше на 67 % та *Bifidobacterium* – 58 % порівняно до контролю.

Крім того зменшився рівень умовно-патогенної мікрофлори *Escherichia coli* на 45 %, *Clostridium* – 27 %, *Enterobacteriaceae* та *Staphylococcus* – 75 %, *Candida* – 80 %, порівняно до контролю.

Встановлений позитивний вплив на мікрофлору шлунково-кишкового тракту корів, де кількість *Lactobacillus sp.* збільшилась на 67 % та *Bifidobacterium* – 58 %. Рівень умовно-патогенної мікрофлори зменшився *Escherichia coli* на 45 %, *Clostridium* – 27 %, *Enterobacteriaceae* та *Staphylococcus* – 75 %, *Candida* – 80 %, порівняно до контролю.

3.6. Визначення впливу пробіотика на метаболізм корів за субклінічного маститу

Робота виконувалась у ТОВ «Агрофірма Лан», с. Кіндратівка, Сумського району, Сумської області. Коровам хворим на субклінічний мастит дослідних груп згодовували концентровані корми з додаванням *Bacillus megaterium* (1×10^9 КУО/г) в дозі 35 г на тварину. Контрольній групі корів давали звичайний раціон для дійних корів. Експеримент тривав 30 діб на поголів'ї корів голштинської породи.

Налагодження взаємозв'язку між інфекційним агентом і організмом дійної корови має фундаментальне значення для впливу на всі фактори зовнішнього середовища, в той час як сприйнятливість дійної корови до маститу також визначається такими факторами, як вік, порядок лактації, його стадія, надій, анатомічні особливості, але в основному імунологічний стан і реактивність молочної залози. Через безліч внутрішніх і зовнішніх причин,

що призводять до маститу, його слід розглядати як багатфакторне захворювання.

Субклінічний мастит у корів відобразився у біохімічному дослідженні крові значним зниженням глобулінів, що вказує на ураження імунної відповіді у організмі (табл.3. 11).

Таблиця 3.11

Результати біохімічних досліджень сироватки крові корів, (n=15)

Загальний білок, г/л	Альбу-міни, г/л	*Глобуліни, г/л	*Альбу-міни, %	*Глобуліни, %	*(А/Г), од	Сечовина, ммоль/л	*Азот сечовини, мг/дл
СОП-БП-02-2017	СОП-БП-25-2018	розрахунок				СОП-БП-03-2017	розрахунок
Контрольна група							
86,24 ±0,22	32,06 ±0,14	54,18 ±0,19	38,18 ±0,22	61,82 ±0,23	0,60 ±0,02	5,09 ±0,06	14,27 ±0,10
Дослідна група (початок дослідження)							
63,67 ±0,18	31,72 ±0,19	31,95 ±0,12	49,82 ±0,19	50,18 ±0,13	0,99 ±0,04	5,14 ±0,02	23,57 ±0,08
Дослідна група (закінчення дослідження)							
87,02* ±0,13	31,07 ±0,18	55,95* ±0,21	35,70 ±0,20	64,30 ±0,24	0,56 ±0,04	4,11 ±0,06	11,52* ±0,03
Референтні значення для корів							
59-85 ² 70-90 ³	27-43 ²	25-45 ² 33-55 ³	38-50 ¹	50-62 ¹	0,6- 1,1	3,30-6,70 ¹ 2,50-6,70 ³	8-20 ⁴

Примітка: * – $p \leq 0,05$ порівняно до дослідних тварин на початку дослідження.

Отримані результати дають зрозуміти, що застосований для лікування корів від маститу *Bacillus megaterium* проявляє імуностимулюючу дію на організм, при цьому обмін азоту в організмі залишився у межах фізіологічної норми.

До початку дослідного періоду у корів із діагнозом субклінічний мастит був підвищений рівень азоту сечовини на 48,87 %, що вище допустимих референтних показників для корів. Цей показник може вказувати на розвиток субклінічного кетозу у дійних корів, що може бути однією з причин виникнення маститу у корів у перші дні після отелення.

Перехідний період у корів зазвичай триває як період за три тижні до і через стільки ж після пологів. Однак метаболічні зміни можуть розпочатись завчасно і мати важкі ускладнення після отелення. Такими наслідками вважається кетоз та післяродовий парез.

Нажаль, у господарствах не проводиться своєчасна адаптація тварин. Перехід від пізньої вагітності до ранньої лактації є найбільш складним періодом для дійної корови через швидке збільшення потреби в поживних речовинах для підтримки зростання плоду і вироблення молозива і молока. На початку лактації потреба в енергії збільшується приблизно на 300%, а потреба в кальції збільшується більш ніж на 65 % для підтримки лактогенезу. В цей період у корів суттєво підвищується ризик виникнення маститу.

Лікування і профілактика маститу містить контроль кількості соматичних клітин, правильне харчування, утримання і догляд, доїння і сухостій в умовах молочного тваринництва. Причини виникнення маститу можна поділити на дві групи. До першої групи відносять запалення молочної залози та молочних протоків, викликаних мікроорганізмами патогенними та умовно патогенними. Основна етіологія у другій групі – порушення технології доїння, обміну речовин, травми вимені і різні стресові фактори в розвитку маститу.

За результатами досліджень рівень кальцію та фосфору у межах фізіологічної норми у контрольних та дослідних тварин протягом усього

експерименту. Цей факт вказує на відсутність схильності у тварин до такого захворювання як післяродовий парез, який пов'язаний із Са/Р співвідношенням у організмі дійних корів (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Результати біохімічних досліджень зразків сироватки крові ВРХ, (n=15)

Назва параметрів, що визначаються, одиниці вимірювання								
Заг.холестерин, ммоль/л	АСТ, од/л	АЛТ, од/л	*(АСТ/ АЛТ),о д	Загальний Са, ммоль/л	Неорганіч. Р, ммоль/л	*Са/Р, од	КСК, тис/см ³	кМАФАнМ, 103КУО/см ³
СОП-БП-07-2017	СОП-БП-09-2017	СОП-БП-08-2017	Розрахунок	СОП-БП-05-2017	СОП-БП-04-2017	розрахунок	мікроскопічний тест	мікроскопічний тест
Контрольна група								
2,25 ±0,09	71,09 ±0,24	17,11 ±0,10	1,64 ±0,08	2,18 ±0,06	2,08 ±0,2	1,10 ±0,03	80,35 ±7,21	<1×10 ²
Дослідна група (початок дослідження)								
5,81 ±0,04	147,04 ±0,35	33,64 ±0,12	4,37 ±0,03	2,40 ±0,06	2,07 ±0,06	1,16 ±0,06	8340,44 ±127,22	26×10 ²
Дослідна група (закінчення дослідження)								
2,28 ±0,03	78,96 ±0,31*	17,27 ±0,22*	3,25 ±0,05	2,06 ±0,06	2,02 ±0,06	1,12 ±0,06	120,53 ±0,06*	3×10 ²
Референтні значення для корів								
2,20 -6,60 ²	48- 108 ²	17-40 ² 20-45 ³	1,0- 3,4	1,98- 3,12 ^{1,2} 2,2-2,6 ³	1,50- 2,90 ^{1,2} 1,2-2,4 ³	1,1- 1,6	≤400 Гатунок Екстра	Гатунок ≤100 Екстра ≤300 Вищий ≤500 Перший

Примітка: * – p≤0,05 порівняно до дослідних тварин на початку дослідження.

Виходячи з отриманих даних можна зробити висновок, що у господарстві збалансований раціон для групи дійних корів підібраний

правильно. Тому проблеми, які пов'язані із розвитком субклінічного маститу мають етіологію бактеріальних та стресових факторів.

Запальні процеси в організмі, пов'язані із маститом проявились при визначенні показників аспартатамінотрансферази (АСТ) та аланінамінотрансферази (АЛТ) та їх співвідношення у тварин дослідних груп на початку лікування.

Так рівень метаболітів у хворих корів по закінченню періоду лікування був менше АСТ на 53,69 % та АЛТ – 51,33 %, порівняно до початку дослідження. Результати підтверджують відсутність токсичного впливу використаного пробіотику для лікування корів від маститу.

Крім того, доведено, що використання *Bacillus megaterium* (1×10^9 КУО/г) в дозі 35 г тварині має лікувальний ефект на організм в цілому та зменшення запальних процесів у вимені корів. Підтвердженням цих результатів є показник кількості соматичних клітин (КСК), який по завершенню дослідження зменшується у 70 разів, порівняно до початку експерименту у хворих на субклінічний мастит корів, що відповідає ґатунку «Екстра».

Крім того, кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (кМАФАНМ) у молоці зменшується на 88,46 % по закінченню періоду лікування у хворих тварин, що відповідає ґатунку «Вищий».

Враховуючи поліетіологічний характер субклінічного маститу і затримку в діагностиці та реєстрації, моніторингу та профілактиці на рівні стада, ветеринарні лікарі проводити симптоматичне лікування тільки одного ізольованого захворювання. Погляд тільки з одного ракурсу на цю проблему не дає достатньої інформації та ефективного вирішення проблеми для молочної галузі. Тому ретельний моніторинг у перехідний період (із сухостою у післяродовий) молочних корів з урахуванням всіх факторів, що впливають на здоров'я і продуктивність, дозволяє вчасно вирішувати виникаючі проблеми і покращувати здоров'я, благополуччя і продуктивність тварин.

В результаті проведених досліджень встановлено, що використання коровам із субклінічним маститом *Bacillus megaterium* (1×10^9 КУО/г) в дозі 35 г на тварину сприяє зменшенню запалення вимені та нормалізації рівня метаболітів (АЛАТ і АСТ).

Пробіотик *Bacillus megaterium* проявляє бактерицидні властивості, на що вказують кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів та кількість соматичних клітин. Використання пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* не викликає токсичного впливу на органи та системи організму. Сприяє нормалізації метаболічних процесів в організмі.

3.7. Вплив *Bacillus* на продуктивність корів

Дослідження на субклінічний мастит починали з визначення корів хворих на субклінічний мастит у стаді. Причинами маститу у корів можуть бути мікроорганізми та фактори не інфекційного характеру. Порушення технології доїння, метаболічні захворювання, травми вимені, стрес після пологів дають підставу вважати мастит багатфакторним захворюванням. Також під час проведення моніторингу стада на субклінічний мастит з'ясовано, що у хворих корів спостерігали одночасно субклінічний кетоз та розлади травлення. У частини корів виявляли затримку посліду після отелення та ендометрит. Весь цей комплекс симптомів наводить на думку, про поліетиологічний механізм виникнення маститу у корів. Корів на субклінічний мастит досліджували за допомогою Каліфорнійського тесту та методом мікроскопії мазків (рис.1-2).

Відомо, що кількість соматичних клітин на період лактації повинна бути в межах до 400 тис/см³, згідно з DSTU 3662-97. Соматичні клітини поділяються на лімфоцити, нейтрофіли та моноцити, які вказують на рівень запалення молочної залози (рис. 3.7–3.8).

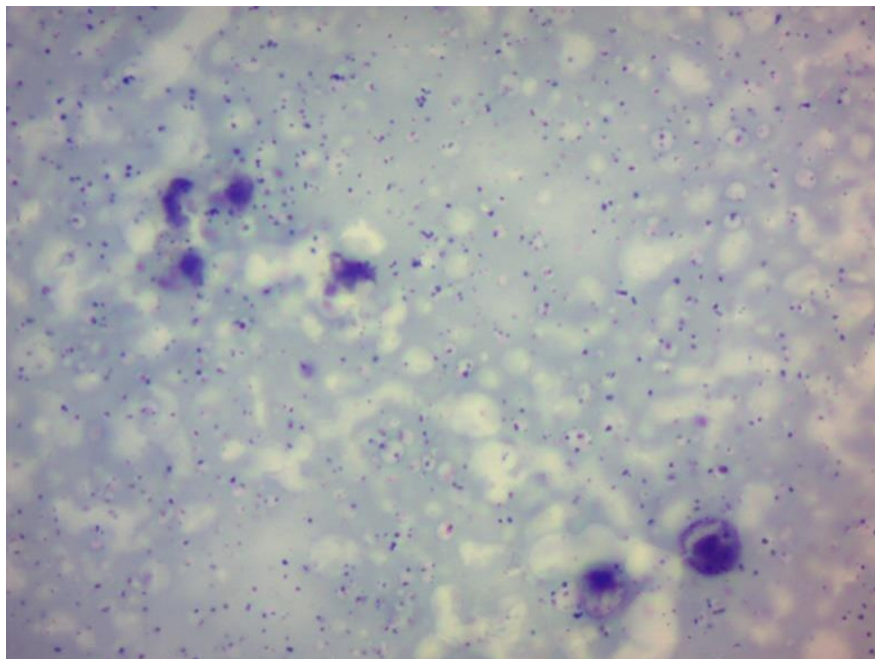


Рис. 3.7 Світлова мікроскопія молока здорової корови, поодинокі лейкоцити в полі зору (збільшення $\times 1000$)

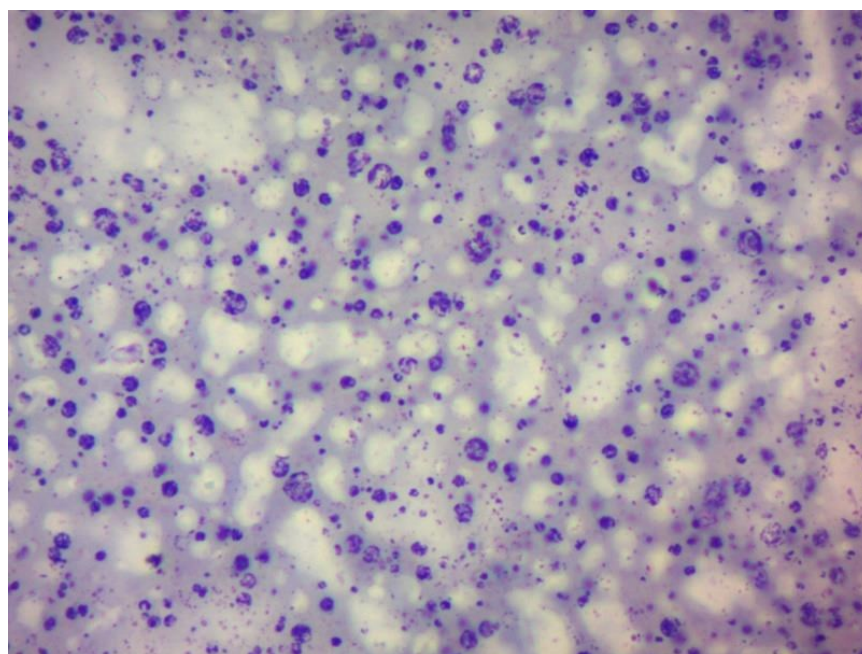


Рис. 3.8 Світлова мікроскопія молока корови, за субклінічного маститу. Масове скупчення соматичні клітини (збільшення $\times 400$)

Запалення молочної залози призводить до клітинної реакції, при якій збільшується кількість соматичних клітин в десять і більше разів. Встановлено, що кількість нейтрофілів в молоці корів може постійно змінюватись. Соматичні клітини в основному представлені епітеліальними клітинами (60 %) та незначною кількістю гранулоцитів та лімфоцитів.

Подібну тенденцію реєстрували при визначенні вмісту субпопуляцій СК у козинячому молоці. При збільшенні СК у молоці до 2 мільйонів клітин/мл збільшується і кількість нейтрофілів, макрофагів та еозинофілів. Тому видовий склад соматичних клітин може змінюватись залежно від ступеню запалення молочної залози.

Без надання терапевтичної допомоги своєчасно невиявлений субклінічний мастит може перейти у клінічний. Крім того, за субклінічного маститу окрім СК у молоці накопичуються мікроорганізми. У телят виникає діарея та запалення сичуга при випоюванні молока від хворих корів.

Навіть при відсутності в молоці патогенного збудника, збільшення кількості мезофільних аеробних та факультативних анаеробних мікроорганізмів (кМАФАНМ) понад 100 тис. КУО/см³ є показником безпечності молока для споживання (ДСТУ 3662:2018).

Тому для визначення безпечності молока проводили дослідження у молочних господарствах з метою встановлення основних патогенів, які є однією з причин виникнення маститу у корів (табл. 3.14).

За результатами проведених досліджень визначено, що у зразках молока хворих на мастит корів переважно виявляли *S. aureus*. – 22 %, *S. agalactiae* – 15 %, *E. coli* ентерогеморагічна – 12 %, *E. coli* – 10 %, *Candida* – 10 %, *E. fecalis* – 9 %, *S. epidermidis* – 8 % та *Mycoplasma spp.* – 7 %.

Отримані результати вказують на значну кількість стафілококів у молоці, які як правило виділяються у мікробному середовищі тваринницьких приміщень. Дослідження вчених показали, що стафілокок був третім за поширеністю мікроорганізмом і позитивно корелював із захворюванням на субклінічний мастит в період сухостою корів.

Також стафілокок має максимальну стійкість до ампіциліну, порівняно з іншими мікроорганізмами.

Подібний рівень стійкості (44 %) був зареєстрований для *S. aureus* (n=50), виділених з великої рогатої худоби та свиней.

Таблиця 3.13

Результати дослідження молока корів на загальне бактеріальне забруднення

Кількість досліджених зразків молока, шт.	Найменування показника	%, від загальної кількості дослідних зразків молока
53	<i>S.aureus</i>	22
56	<i>S. agalactiae</i>	15
40	<i>E. coli</i> ентерогеморагічна	12
37	<i>E. coli</i>	10
36	<i>Candida</i>	10
42	<i>E. fecalis</i>	9
39	<i>S. epidermidis</i>	8
51	<i>Mycoplasma spp.</i>	7

За результатами досліджень проведених на коровах чорно-рябої породи виявлено, що *Staphylococcus aureus* був причиною субклінічного маститу в 67–73 %, а *Streptococcus agalactiae* 20 % – всіх випадків. Встановлено, що шляхом передачі збудника маститу була гума доїльних стаканчиків.

Таким чином, наявність у молоці тільки *S. aureus* та *S. agalactiae* достатньо для виникнення клітинної реакції у вигляді маститу. Для дійних корів є великою проблемою лікування субклінічного маститу. Традиційно для лікування субклінічного маститу у господарствах використовують антибіотики та сульфаніламіді. Нажаль тривалий період молоко доводиться утилізувати протягом всього періоду лікування та після останнього дня від 14 до 28 діб, залежно від фармакокінетики препарату. Про початок запального процесу у молочній залозі свідчила відсутність характерних симптомів клінічного маститу. В більшості випадків діагноз на субклінічний мастит був встановлений завдяки регулярному тестуванню та визначення КСК.

Особливо це важливо у тих господарствах, рентабельність яких залежить від якості молока (сортність). В основному такі господарства виробляють молоко класу «Екстра», до якого є цілий ряд вимог. Через те що молоко реалізується збірне, то частина продукції від корів з субклінічним маститом звичайно може потрапити до загальної об'єму. Однак, коли у господарстві великий відсоток корів з субклінічним маститом приховати це уже не можливо. Окрім КСК у молоці підраховується загальна кількість мікроорганізмів. Звичайно вимоги до продукції, яка реалізується для вживання споживачу, повинні бути максимально жорсткими. Це стимулює виробників до контролю якості отриманої продукції, а саме своєчасному виявленню, лікуванню та профілактиці маститу. Тому постійно ведеться пошук альтернативних методів профілактики та лікування субклінічного маститу у корів.

Був проведений виробничий дослід по визначенню впливу *Bacillus megaterium* NCH 55 на молочну продуктивність корів. Коровам, хворим на субклінічний мастит разом з концентрованими кормами задавали спори *Bacillus megaterium* NCH 55 (1×10^9 КУО/г) в дозі 35 г на тварину протягом 30 діб. Під час проведення експерименту визначали якість отриманого молока та молочну продуктивність

У корови UA8014876120 на червень місяць лактація була 14 кг/добу, кМАФАнМ 560 тис.КУО/см^3 та КСК 800 тис/см^3 , що вказує на запалення вимені. У червні проводили лікування пробіотиком, при цьому продуктивність збільшилась на 85,7 %; при зменшенні кМАФАнМ та КСК на 44,64 % та 51,87 % відповідно. В серпні продуктивність корови збільшилась до 34 кг/добу та якісні показники молока відповідали гатунку «Екстра».

У тварини UA8010629706 на початку дослідження продуктивність складала 37 кг/добу, однак з березня по червень показники коливались від 21 до 28 кг/добу, що було пов'язано із зміною кормів і збільшенням кМАФАнМ та КСК на 250 % та 152,94 % відповідно. Термін лікування склав 30 діб у липні. По завершенню експерименту в серпні молочна продуктивність була

35 кг/добу, якість молока відповідала гатунку «Екстра». Корова UA8013283674 мала високу продуктивність з лютого по травень на рівні 35-37 кг/добу, однак при цьому погіршувалась якість молока. У червні збільшились показники кМАФАНМ та КСК на 428,57 % та 515 %, що вказує на розвиток субклінічного маститу. Після лікування на основі *Bacillus megaterium* продуктивність повернулась до початкових показників, якість молока відповідала ДСТУ 3662:2018 (табл. 3.14).

З лютого по червень продуктивність корови UA8013420982 була на рівні 14-15 кг/добу з поступовим погіршенням якості молока. Терапія пробіотиком у липні дозволила збільшити продуктивність на 86,6%; зменшився вміст кМАФАНМ на 61,19 % та КСК – на 125 %, порівняно до початку дослідження. Подібна картина розвитку субклінічного маститу спостерігалась у тварини UA6100439832. В результаті лікування на серпень місяць показники продуктивності практично не відрізнялись від початкових; знизився рівень кМАФАНМ на 140 % та КСК – на 342,30 %. Якість молока відповідала гатунку «Перший». У корови UA8013283631 протягом березня та липня продуктивність коливалась у межах 20-25 кг/добу. Якість молока погіршилась у червні, після чого тварина отримала лікування пробіотиком. На момент завершення експерименту продуктивність збільшилась на 31,81 %, знизились кМАФАНМ та КСК на 62,84 % та 42,5 %, що відповідає гатунку «Вищій». У тварини UA8012102570 виявлена низька продуктивність та якість молока. Тому у липні місяці корова отримала терапію на основі *Bacillus megaterium*. По завершенню експерименту в місяці продуктивність корови збільшилась на 75 %; зменшилися кМАФАНМ та КСК на 81,42 % та 45,34 %, молоко згідно ДСТУ 3662:2018 відповідало гатунку «Екстра». В травні та червні у корови UA8013283670 зменшилась молоковіддача та погіршилась якість молока.

Таблиця 3.14

Продуктивність корів під час лікування *Bacillus megaterium* NCH 55

Ідентифікаційний Номер тварини	Дата народження	Останнє отелення	№ лактації	2021 рік (місяці експерименту)						
				Лютий	Березень	Квітень	Травень	Червень	Липень	Серпень
				кг/добу						
UA8014876120	06.06.19	12.06.21	1	-	-	-	-	14	26	34
кМАФАнМ, тис.КУО/см ³				-	-	-	-	560	250	75
КСК, тис/см ³				-	-	-	-	800	415	120
UA8010629706	11.03.14	05.01.21	4	37	21	25	28	27	26	35
кМАФАнМ, тис.КУО/см ³				65	120	180	210	300	150	59
КСК, тис/см ³				122	340	450	510	520	230	140
UA8013283674	20.11.17	16.01.21	2	35	36	37	36	29	22	35
кМАФАнМ, тис.КУО/см ³				70	110	120	180	300	150	68
КСК, тис/см ³				100	150	360	420	515	150	137
UA8013420982	18.03.18	21.06.20	1	15	15	15	14	15	15	28
кМАФАнМ, тис.КУО/см ³				420	450	510	530	780	460	257

Продовження табл. 3.14

КСК, тис/см ³				400	410	450	500	670	720	500
UA6100439832	04.08.13	04.01.21	6	24	21	37	30	32	20	25
кМАФАНМ, тис.КУО/см ³				150	180	100	240	350	240	210
КСК, тис/см ³				130	220	400	420	670	840	445
UA8012102570	17.04.16	07.06.21	4	-	-	-	-	20	26	35
кМАФАНМ, тис.КУО/см ³				-	-	-	-	350	100	65
КСК, тис/см ³				-	-	-	-	430	200	195
UA8013283631	01.11.17	26.03.21	2	-	22	23	25	22	20	29
кМАФАНМ, тис.КУО/см ³				-	110	150	300	450	300	280
Кількість соматичних клітин, тис/см ³				-	350	400	670	800	630	340
UA8013283670	19.11.17	09.04.21	2	-	-	29	25	25	28	32
кМАФАНМ, тис.КУО/см ³				-	-	90	130	300	100	87
КСК, тис/см ³				-	-	190	200	420	250	200
UA8014655883	07.03.19	17.04.21	1	-	-	28	29	30	26	32
кМАФАНМ), тис.КУО/см ³				-	-	110	120	250	110	75
КСК, тис/см ³				-	-	180	270	350	260	156
UA8014703811	22.03.19	11.03.21	1	-	20	31	27	25	25	30
кМАФАНМ, тис.КУО/см ³				-	110	120	210	290	150	90
КСК, тис/см ³				-	320	550	670	800	400	180

По завершенню експерименту у серпні продуктивність збільшилась на 28 %, зменшились кМАФАнМ – на 29 % та КСК – на 47,61 %. У корови UA8014655883 в місяці продуктивність була високою, але погіршилась якість молока. Продуктивність тварини виросла по закінченню експерименту на 18,75 %; при цьому зменшився кМАФАнМ та КСК на 233,33 % та 124,35 % відповідно.

З травня по червень у тварини UA8014703811 поступово зменшувалась молочна продуктивність, також збільшувалась кількість мікроорганізмів та соматичних клітин у молоці. Після лікування у корови зросла продуктивність на 20 %; зменшились кМАФАнМ та КСК на 68,95 % та 77,5 % відповідно.

В ході проведення дослідження відмічали покращення загального стану тварин. У корів підвищився апетит та поступово збільшилась молоковіддача. Також по завершенню експерименту молочна продуктивність становила у 40 % – 34-35 кг/добу; у 30% – 30-32 кг/добу та 30 % – 25-29 кг/добу.

У 70 % корів, які на 30 добу досліджень досягли продуктивності більше 30 кг/добу показники молока такі як кількість соматичних клітин (КСК ≤ 400 тис/см³) та кМАФАнМ (≤ 100 тис. КУО/см³) відповідали класу «Екстра».

Коровам, які не досягли продуктивності 30 кг/добу продовжили лікування в індивідуальному порядку. При цьому у молоці корів кількість соматичних клітин була ≤ 500 тис/см³ та кМАФАнМ ≤ 200 тис. КУО/см³. Таке молоко придатне до споживання, але відповідає технічним умовам ґатунку «Вищий» або «Перший» і реалізується за нижчою вартістю. Вважаємо, що термін одужання тварин хворих на субклінічний мастит залежав від ступеня ураження молочної залози та індивідуальних особливостей організму. Дію пробіотичного препарату в організмі тварин прослідкувати достатньо складно, оскільки цей вплив багатовекторний.

Так дослідниками доведено, що пробіотики не обов'язково спрямовані тільки на відновлення мікробної спільноти, оскільки, наприклад, деякі види пробіотиків підвищують стійкість організму тварин до колонізації патогенами, а також на їх знищення. *Bacillus megaterium* найбільшій за

розміром із родини *Bacillus*. *Bacillus megaterium*, розмножуючись, створює специфічне середовище, покращує мікрофлору рубця. Крім того, *Bacillus megaterium* знищує патогенні мікроорганізми за рахунок продукції високоспецифічного протимікробного білка – мегацину.

За результатами проведеного дослідження встановлено, що *S. aureus* виділений у 22 % дослідних зразків молока корів хворих на субклінічний мастит. Соматичні клітини молока здорової корови представлені в основному епітеліальними клітинами, поодинокими сегментоядерними нейтрофілами, моноцитами та базофілами. У молоці хворих на субклінічний мастит корів спостерігається збільшення в десятки разів епітеліальних клітин, лімфоцитів, базофілів; нейтрофілів та моноцитів.

Дослідженнями встановлено, що в процесі розвитку запалення вимені у молоці корів одночасно збільшується кількість соматичних клітин та мікроорганізмів і зменшується молоковіддача. Також продуктивність корів зменшується у перехідний зимово-весняний період через зміну корму та кліматичних умов. Лікування хворих на субклінічний мастит корів пробіотичним штамом *B. megaterium* NCH 55 дало можливість збільшити продуктивність у 70 % корів та поліпшити якість молока до гатунку «Екстра».

3.8. Схема застосування *B. megaterium* NCH 55 для дійних корів для лікування та профілактики субклінічного маститу

Через обмеження на використання протимікробних препаратів у тваринництві, особливо для лактуючих корів, у господарствах більше використовують альтернативні методи лікування. Субклінічний мастит у корів є великою проблемою для фермерів. Мастит може уражувати більшу частину поголів'я, якщо його не контролювати. Постійний моніторинг хворих на запалення вим'я корів і видалення їх зі стада для подальшого лікування зменшує ризик розповсюдження інфекції. У роботі досліджений

пробіотичний штам *Bacillus megaterium* NCH 55, доведений його лікувальний ефект при субклінічному маститі у корів, позитивний вплив на мікроботу шлунково-кишкового тракту, метаболізм та продуктивність корів.

Були проведені дослідження по визначенню терапевтичного ефекту від застосування коровам, хворим на субклінічний мастит *B. megaterium* NCH 55. Тваринам першої дослідної групи згодовували 15 г *Bacillus megaterium*; другої – 25 г, третьої – 35 г. Для уточнення отриманих результатів та встановлення лікувального ефекту пробіотику за субклінічного маститу корів проведенні дослідження молока на початку та після закінчення дослідження (табл.3.15).

Таблиця 3.15

**Результати дослідження молока за використання *Bacillus megaterium*,
($M \pm m$, $n = 10$)**

Групи тварин	кМАФАнМ, 10^3 КУО/см ³ (молоко екстра ≤ 100)		Кількість соматичних клітин в молоці (КСК), тис/см ³ (молоко екстра ≤ 400)	
	на початку захворювання	після лікування	на початку захворювання	після лікування
I дослідна	90 $\pm$ 1,36	73 $\pm$ 1,25	934,2 $\pm$ 123,4	621,5 $\pm$ 132,9
II дослідна	85 $\pm$ 1,28	67 $\pm$ 1,35	925,7 $\pm$ 113,8	386,9* $\pm$ 109,4
III дослідна	92 $\pm$ 1,45	55 $\pm$ 1,40*	897,5 $\pm$ 110,6	108,5* $\pm$ 110,6
Контрольна група	50 $\pm$ 1,18	52 $\pm$ 1,20	76,8 $\pm$ 5,6	75,4 $\pm$ 4,9

Примітка: – $P \leq 0,05$ порівняно початком досліджень. Згідно ДСТУ 7357:2013 «Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання»

Застосування *Bacillus megaterium* у дозі 15 г тваринам протягом 30 діб

сприяло зменшенню мікрофлори в молоці на 18 % та кількості соматичних клітин на – 33,5 %, порівняно до початку лікування.

При збільшенні дози *B. megaterium* до 25 г корові відбувалось зменшення кМАФАНМ та КСК на 21,2 % та 58,2 % відповідно, порівняно до початку дослідження.

Повернення показників молока до класу екстра відбувалось при задаванні тваринам *B. megaterium* у дозі 35 г протягом місяця. При цьому кількість мікрофлори у молоці зменшилась на 40,2 % та кількість соматичних клітин – 87,9 %. Важливим результатом є ефективне лікування корів від субклінічного маститу без застосування антимікробних засобів, а також покращення мікробіому.

Своєчасна діагностика та лікування субклінічного маститу у корів є одним з важливих завдань ветеринарного лікаря. Повернення молочної продуктивності та виробництво молока до класу екстра дуже важливе з економічних міркувань для господарників, у яких рентабельність підприємства залежить напряду від якості продукції.

Використання в якості пробіотику *Bacillus megaterium* (1×10^9 КУО/г) у дозі 35 г на тварину протягом 30 діб сприяє збільшенню кількості корисної мікрофлори та пригнічення умовно-патогенної. За рахунок покращення мікробіому підвищується імунітет у тварин та відновлюється молочна продуктивність.

Молоко, яке отримане від корів що одужали не містить антибіотиків, має безпечну кількість мікроорганізмів та соматичних клітин. Отже цю продукцію можна використовувати без обмежень для споживачів.

За результатами проведених досліджень доведено лікувальну ефективність *Bacillus megaterium* (1×10^9 КУО/г) у дозі 35 г на тварину протягом 30 діб за субклінічного маститу. Після проведеного лікування кількість мікрофлори у молоці корів зменшилась на 40,2 % та кількість соматичних клітин – 87,9 %.

За результатами проведених досліджень була розроблена схема

застосування *Bacillus megaterium* NCH 55 для корів у різні періоди лактації та захворювань (табл.3.16).

Таблиця 3.16

Схема застосування *Bacillus megaterium* NCH 55 для молочних корів

Групи корів	<i>Bacillus megaterium</i> NCH 55	
	1×10^7 , КУО/г	1×10^9 , КУО/г
Сухостійного періоду	35 г на добу протягом 10 діб перед отеленням	-
Після отелення	35 г на добу протягом 14 діб	-
Лікування	-	35 г на добу протягом
З субклінічним маститом		30 діб до повного зникнення симптомів
З порушенням функції системи травлення (дисбактеріоз)		35 г на добу протягом 14 діб до повернення нормального складу мікробіота

Дослідженнями доведено, що субклінічний мастит є поліетіологічним захворюванням і тісно пов'язаний з роботою шлунково-кишкового тракту корів. Також встановлено, що початок розвитку субклінічного маститу може відбуватись як у сухостійний період, так і після отелення корів в наслідок стресу. Тому профілактика маститу на ранніх етапах має ключове значення для запобігання виникнення захворювання.

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ, АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Використання антибіотиків останнім часом значно зросло через збільшення частоти інфекцій і тому патогенні бактерії стали більш стійкими до препаратів. Пошук засобів лікування стійких патогенних бактерій є складним завданням, і витрати на розробку нових препаратів стали дорожчими [111]. Неконтрольоване використання антибіотиків [122] також може призводити до виникнення у тварин алергічних реакцій, зниження імунітету та зменшення кількості корисної мікрофлори у кишечнику. Зниження ефективності протимікробних препаратів та підвищення резистентності патогенів стало причиною розробки нових альтернативних методів лікування [148].

Бактерія *B. megaterium* зустрічається в різноманітних середовищах від їжі, морської води, опадів і навіть в бджолиному меді. Цей штам має високу здатність до виробництва екзоферментів. Були проведені дослідження що до безпечності штаму *Bacillus megaterium* NCH 55 для тварин. Інвазивність штаму визначали за можливих природних шляхів поступлення останніх в організм, а саме по спроможності клітин проникати всередину тканин органів тварин після перорального зараження. Мишам вводили одноразово per os активну культуру бактерій в максимальних дозах, які не призводили до загибелі тварин. В результаті проведених досліджень встановлено, що в період спостереження після внутрішньочеревного введення суспензії клітин бактерій у дозі 1 млрд. не встановлено зміни поведінкових реакцій тварин, всі тварини добре поїдали корм, змін з боку шкірного покриву не помічено. Була відсутня достовірна різниця в масі тіла дослідних і контрольних тварин. Миші були активними, фізіологічні відправлення у них не порушувались,

поведінкові реакції були звичайними. Клінічних ознак інфекційного ураження тварин не встановлено. Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин при висіві зразків на СКА через 14 діб після в/ч ін'єкцій не виявили носійства культури у нирках та печінці. Отримані при внутрішньочеревному введенні результати свідчать про можливість приналежності штаму по ступені небезпеки мікроорганізмів до 4-го класу, а саме — мало небезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії. На 14 добу після внутрішньочеревної ін'єкції 1×10^9 клітин/мишу не спостерігається носійства культури у печінці та нирках тварин.

Всі дослідні і контрольні миші, які залишились живими після закінчення терміну спостережень, були вбиті, проведено їх розтин і дослідження внутрішніх органів. Відсутність інфекційної патології і ознак ураження дослідних тварин було підтверджено при макроскопічному вивченні внутрішніх органів.

Таким чином, штам *Bacillus megaterium* NCH 55 згідно отриманих у гострих дослідів результатів та відповідних нормативних матеріалів є авірулентним неінвазивним мікроорганізмом, що належить до непатогенних мікроорганізмів IV класу небезпеки: «мало небезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії». LD_{50} пер ос $> 8 \times 10^9$, LD_{50} в/ч $> 1 \times 10^9$ клітин/мишу. Мікроорганізми цього класу небезпеки дозволені МОЗ України до використання у виробництві. Дослідження проведені для депонування культури як первинна санітарно-гігієнічна оцінка штаму.

Антагоністичну активність *B. megaterium* NCH 55 визначали за класичним методом відтермінованого антагонізму. Для цього штами вирощували протягом доби при t 37°C до окремих макроколоній на пластинках 2 % м'ясопептонного агару. За результатами проведених досліджень було встановлено, що до *B. megaterium* NCH 55 не були чутливі культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 та *Aspergillus niger*. Інші еталонні штами мікроорганізмів проявили високу чутливість до *B. megaterium* NCH 55 згідно методики проведення дослідження.

В роботі також визначали антагоністичні властивості пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* стосовно мікроорганізмів-ізолятів [150], отриманих у молочних господарствах від корів хворих на субклінічний мастит. За результатами отриманих досліджень встановлено, що у розведенні 1×10^9 , КУО/г *B. megaterium* NCH 55 проявляв максимальні антагоністичні властивості у вигляді зони затримки росту відносно всіх вказаних мікроорганізмів. Демаркаційна зона у чашках Петрі з 1×10^9 , КУО/г *B. megaterium* NCH 55 була більше порівняно до 1×10^5 , КУО/г навколо *S. agalactiae* – на 12,2 %; *S. aureus* – 10,5 %; *S. epidermidis* – 16,3 %; *E. fecalis* – 19,6 %; *E. coli* – 8,9 %; *Candida* – 22,62 %.

Диско-дифузійний метод використовується для визначення бактерицидних властивостей, здебільшого антибіотиків. Дослідженнями встановлено, що у розведенні 1×10^9 , КУО/г *B. megaterium* NCH 55 проявляв максимальні антагоністичні властивості у вигляді зони затримки росту відносно всіх виділених ізолятів збудників маститу.

Відомо, що рід *Bacillus* виробляє широкий спектр протимікробних засобів [152]. *B. megaterium* виробляє бактеріюцин, який називається мегацин, який є високоспецифічним протимікробним білком проти широкого спектру грамнегативних та грампозитивних бактерій, дріжджів, грибів.

При проведенні мікроскопічних досліджень було встановлено, що бактерії *B. megaterium* NCH 55 мають вигляд гладких, дещо зігнутих паличок. Вони грампозитивні і здатні утворювати ендоспори. При дослідженні властивостей *B. megaterium* NCH 55 встановлено, що бактерія використовує лактозу та глюкозу як джерела вуглецю. Також встановлено, що бактерія не розщеплює індол, рамному, арабінозу, сорбіт, але здатна утворювати сечовину. Крім того, *B. megaterium* NCH 55 виробляє ферменти мальтозу, целюлазу, манозу, амілазу, манітол.

При дослідженні властивостей *Bacillus megaterium* NCH 55 було встановлено, що індекс адгезійності еритроцитів (ІАЕ) складав $2,00 \pm 0,11$, що відповідно до класифікації Бріліс вважається показником низької адгезії. При

цьому середній показник адгезії (СПА) був $1,70 \pm 0,09$ та коефіцієнт участі еритроцитів в адгезійному процесі (КУЕ) складав $84,25 \pm 2,53$.

Для дослідження чистоти культури *B. megaterium* NCH 55 визначали її антибіотикорезистентність. В результаті досліджень була визначена чутливість *B. megaterium* до протимікробних засобів.

Незважаючи на підвищення якості санітарного та гігієнічного контролю виробництва молока, субклінічний мастит залишається найнебезпечнішим та найсерйознішим захворюванням молочних корів із значними економічними втратами [17, 23, 24]. Негативні економічні наслідки субклінічного маститу включають недоотримання та зниження вартості молока з високим вмістом соматичних клітин та мікроорганізмів, Крім того, збільшується кількість вибракуваних тварин з діагнозом мастит [27, 133].

Проведені дослідження показали, що такі параметри як температура у приміщенні, швидкість руху повітря, вміст газів були у межах нормативних показників для вирощування дійного стада великої рогатої худоби [143]. Через відсутність примусової вентиляції у тваринницькому приміщенні взимку відносна вологість перевищує максимально допустиму межу на 16,36 %. На фоні збільшення вологості в приміщенні також показник мікробної забрудненості перевищував допустимі межі восени на 8,69 %, взимку – 25,21 % та влітку – 14,61 %. Порушення умов утримання тварин та недотримання санітарних норм сприяє створенню умов для виникнення мікробного маститу. Для визначення зазначених ризиків у подальших дослідженнях проводили моніторинг різних форм та збудників маститу.

Не менш важливі негативні впливи пов'язані з низькою технологічною якістю сирого молока, що використовується в молочній промисловості, та наявністю збудників маститу та їх токсинів у молоці та молочних продуктах [115]. На основі більш ніж 70-річних систематичних досліджень маститу у жуйних прийнято загальну тезу про те, що хвороба є поліетіологічною та багатofакторною, а тому вимагає комплексного підходу для зниження захворюваності.

Опитування, проведене [29] показали, що 23% корів, які залишають стада надто рано, вибраковуються через проблеми зі здоров'ям вимені.

Так проведення моніторингу збудників маститу у корів показало, що на молочно-товарних фермах субклінічна форма маститу діагностувалась частіше у Сумському районі на 33,4 %; у Лебединському – на 17,8 %; у Конотопському – на 45,4 %; у Шосткінському – на 42,8 %; у Роменському – на 34,3 %; у Охтирському – на 21,9 %. Отримані результати обумовлені санітарними умовами утримання корів, технологією доїння та періодом лактації. Також за результатами визначення основного складу мікрофлори у молоці корів встановлено, що основними збудниками субклінічного маститу є *S. agalactiae* (20 %), *S. aureus* (17 %), *S. epidermidis* (15 %), *E. fecalis* (12 %), *E. coli* (10 %), *Mycoplasma spp.* (8 %), гриби *Candida* (7 %) та асоційована мікрофлора (11 %) [75, 145].

Також у роботі досліджували патологічні зміни у молоці, які виникають за субклінічного маститу у корів. За результатами проведених досліджень встановлено, що в першу лактацію у корів спостерігали збільшення КСК на сьому добу захворювання на 87,4 %; на десятую –143,0%; п'ятнадцяту – 17,0 %, порівняно до початку хвороби. У корів другої лактації також прослідковується тенденція збільшення запалення вим'я на сьому добу на 78,2 %; десятую –142 %; п'ятнадцяту – 8,0 %. Крім того, можна зазначити, що найбільший рецидив захворювання на субклінічний мастит приходить з сьомої по десятую добу. На п'ятнадцяту добу захворювання запалення дещо зменшується, на що вказує рівень соматичних клітин в молоці корів. Так у корів третьої лактації на сьому добу спостерігали збільшення КСК на 47,3%; десятую –152,6 %; п'ятнадцяту –11,9 %.

У корів четвертої лактації хворих на СМ кількість соматичних клітин в молоці збільшується на сьому добу захворювання на 53,6 %; десятую –126,3 %; п'ятнадцяту – 2,2 %. За виробничими даними корови можуть хворіти на субклінічний мастит тривалий час і без ефективного лікування може переходити у хронічну форму запалення, що в свою чергу може призвести до

виникнення гіпо- та агалактії у тварин.

У тварин п'ятої лактації відбувається підвищення показника КСК у ураженій долі вимені на сьому добу на 63,12 %; десятю –135,3 %; п'ятнадцяту –14,4 %. Крім того, дослідженнями було встановлено, що кількість соматичних клітин (КСК) у молоці корів першої дослідної групи було більше на 65 %, кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (кМАФАНМ) було більше на 31 %, порівняно до здорових тварин у контролі. Також у корів 1 дослідної групи шляхом проведення ПЛР у молоці була виявлена *Mycoplasma spp.* У другій дослідній групі, де був виділений *Staphylococcus spp.* у молоці, КСК та кМАФАНМ було вище на 18,5 % та 98 % відповідно. У корів 3 дослідної групи основний патоген у молоці був виділений *E. coli*. При цьому КСК було вище на 24 %, а кМАФАНМ – на 80 %, порівняно до здорових тварин [140].

Відмінності між впливом *Mycoplasma spp.*, *S. aureus* та *E. coli* [46, 62] на склад молока в цьому дослідженні. У всьому світі повідомлялося, що *Mycoplasma spp.* є основним заразним збудником микоплазменного маститу великої рогатої худоби. У нашому дослідженні корови, інфіковані тільки *Mycoplasma spp.* (дослідна група №1), не показали значного впливу на склад молока, крім кількості соматичних клітин. Корови цієї групи могли перебувати на ранній стадії захворювання. Крім того, необхідно враховувати обмежений розмір вибірки цієї групи ($n = 10$). Однак ефект *Mycoplasma spp.* був значним та зробив свій внесок у групу коінфекції *Mycoplasma* [64, 86]. Незважаючи на те, що деякі дослідження вказують на можливість того, що *S. aureus* та *E. coli* можуть бути причиною маститу [87].

Оскільки захворюваність на мастит у корів тісно пов'язано з роботою шлунково-кишкового тракту [18, 106], в роботі визначали вплив *B. megaterium* на систему травлення [19]. В дозі 15 г на тварину *B. megaterium* (1×10^9 КУО/г) сприяв збільшенню кількості *Lactobacillus sp.* на 10 % та *Bifidobacterium* на 12 % порівняно до контролю [34]. Відбувалось не значне пригнічення умовно-патогенної мікрофлори. Збільшення дози *B. megaterium*

(1×10^9 КУО/г) до 25 г на тварину мало позитивний вплив на мікробіом шлунково-кишкового тракту. При цьому рівень корисної мікрофлори збільшувалось *Lactobacillus sp.* та *Bifidobacterium* на 35 % та 30 % відповідно, порівняно до контролю. Пригнічення умовно-патогенної мікрофлори відбувалось достатньо повільно.

За результатами проведеного дослідження можна сказати, що максимальний позитивний виражений ефект на мікрофлору шлунково-кишкового тракту корів мало використання *B. megaterium* (1×10^9 КУО/г) в дозі 35 г на тварину. При цьому кількість *Lactobacillus sp.* та *Bifidobacterium* була більше на 67 % та 58 % відповідно, порівняно до контролю. Крім того, зменшився рівень умовно-патогенної мікрофлори *Escherichia coli* на 45 %, *Clostridium* –27 %, *Enterobacteriaceae* та *Staphylococcus* –75 %, *Candida* – 80 %, порівняно до контролю.

Для встановлення впливу на організм тварин дослідного пробіотику в роботі визначали вплив *B. megaterium* на метаболізм корів за субклінічного маститу. За результатами проведених досліджень встановлено, що рівень метаболітів у хворих корів по закінченню періоду лікування був менше АСТ та АЛТ на 53,69 % та 51,33 % відповідно, порівняно до початку дослідження. Результати підтверджують відсутність токсичного впливу використаного пробіотику для лікування корів від маститу.

Крім того, доведено, що використання *B. megaterium* (1×10^9 КУО/г) в дозі 35 г тварині має лікувальний ефект на організм в цілому та зменшення запальних процесів у вимені корів. Підтвердженням цих результатів є показник кількості соматичних клітин (КСК), який по завершенню дослідження зменшується у 70 разів, порівняно до початку експерименту у хворих на субклінічний мастит корів, що відповідає ґатунку «Екстра».

Крім того, кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (кМАФАНМ) у молоці зменшується на 88,46 % по закінченню періоду лікування у хворих тварин, що відповідає ґатунку «Вищий».

Також у роботі визначали вплив *B. megaterium* NCH 55 на продуктивність та якість молока.

Був проведений виробничий дослід по визначенню впливу *B. megaterium* NCH 55 на молочну продуктивність корів. Коровам хворим на субклінічний мастит разом з концентрованими кормами задавали спори *B. megaterium* (1×10^9 КУО/г) в дозі 35 г на тварину протягом 30 діб. Під час проведення експерименту визначали якість отриманого молока та молочну продуктивність

У корови UA8014876120 на червень лактація була 14 кг/добу, кМАФАНМ 560 тис.КУО/см³ та КСК 800 тис/см³, що вказує на запалення вимені. У червні проводили лікування пробіотиком, при цьому продуктивність збільшилась на 85,7 %; зменшились кМАФАНМ та КСК на 44,64 % та 51,87 % відповідно. В серпні продуктивність корови збільшилась до 34 кг/добу та якісні показники молока відповідали ґатунку «Екстра».

У тварини UA8010629706 на початку дослідження продуктивність складала 37 кг/добу, однак з березня по червень місяць показники коливались від 21 до 28 кг/добу, що було пов'язано із зміною кормів і збільшенням кМАФАНМ та КСК на 250 % та 152,94 % відповідно. Термін лікування склав 30 діб у липні. По завершенню експерименту в серпні молочна продуктивність була 35 кг/добу, якість молока відповідала ґатунку «Екстра».

Корова UA8013283674 мала високу продуктивність з лютого по травень на рівні 35-37 кг/добу, однак при цьому погіршувалась якість молока. У червні збільшились показники кМАФАНМ та КСК на 428,57 % та 515 % відповідно, що вказує на розвиток субклінічного маститу. Після лікування на основі *Bacillus megaterium* продуктивність повернулась до початкових показників, якість молока відповідала ДСТУ 3662:2018

З лютого по червень продуктивність корови UA8013420982 була на рівні 14-15 кг/добу з поступовим погіршенням якості молока. Терапія пробіотиком у липні дозволила збільшити продуктивність на 86,6%; зменшився вміст кМАФАНМ та КСК на 61,19 % та 125 % відповідно,

порівняно до початку дослідження.

Подібна картина розвитку субклінічного маститу спостерігалась у тварини UA6100439832. В результаті лікування на серпень показники продуктивності практично не відрізнялись від початкових; знизився рівень кМАФАНМ та КСК на 140 % та 342,30 % відповідно. Якість молока відповідала гатунку «Перший».

У корови UA8013283631 протягом березня та липня продуктивність коливалась на межі 20-25 кг/добу. Якість молока погіршилась у червні, після чого тварина отримала лікування пробіотиком. На момент завершення експерименту продуктивність збільшилась на 31,81 %, знизились кМАФАНМ та КСК на 62,84 % та 42,5 % відповідно, що відповідає гатунку «Вищий».

У тварини UA8012102570 була низька продуктивність та низька якість молока. Тому у липні місяці корова отримала терапію на основі *B. megaterium*. По завершенню експерименту в серпні місяці продуктивність корови збільшилась на 75 %; зменшилися кМАФАНМ та КСК на 81,42 % та 45,34 % відповідно, молоко згідно ДСТУ 3662:2018 відповідало гатунку «Екстра».

В травні та червні у корови UA8013283670 зменшилась молоковіддача та погіршилась якість молока. По завершенню експерименту у серпні продуктивність збільшилась на 28 %, зменшилися кМАФАНМ та КСК на 29 % та 47,61 %.

У корови UA8014655883 в червні продуктивність була високою, але погіршилась якість молока. Продуктивність тварини виросла по закінченню експерименту на 18,75 %; при цьому кМАФАНМ та КСК зменшився на 233,33 % та 124,35 % відповідно.

З травня по червень місяць у тварини UA8014703811 поступово зменшувалась молочна продуктивність, також збільшувалась кількість мікроорганізмів та соматичних клітин у молоці. Після лікування у корови зросла продуктивність на 20 %; зменшилися кМАФАНМ та КСК на 68,95 % та 77,5 % відповідно, порівняно до початку дослідження.

В ході проведення дослідження відмічали покращення загального стану тварин. У корів підвищився апетит та поступово збільшилась молоковіддача. Також по завершенню експерименту молочна продуктивність становила у 40 % – 34-35 кг/добу; у 30% – 30-32 кг/добу та 30 % – 25-29 кг/добу.

У 70 % корів, які на 30 добу досліджень досягли продуктивності більше 30 кг/добу показники молока такі, як кількість соматичних клітин (КСК ≤ 400 тис/см³) та кМАФАНМ (≤ 100 тис.КУО/см³) відповідали класу «Екстра».

Коровам, які не досягли продуктивності 30 кг/добу продовжили лікування в індивідуальному порядку. При цьому у молоці корів кількість соматичних клітин була ≤ 500 тис/см³ та кМАФАНМ ≤ 200 тис.КУО/см³. Таке молоко придатне до споживання, але відповідає технічним умовам ґатунку «Вищий» або «Перший» і реалізується за нижчою вартістю. Вважаємо, що термін одужання тварин хворих на субклінічний мастит залежав від ступеня ураження молочної залози та індивідуальних особливостей організму. Дію пробіотичного препарату в організмі тварин прослідкувати достатньо складно, оскільки цей вплив багатовекторний.

Так дослідниками доведено, що пробіотики не обов'язково спрямовані тільки на відновлення мікробної спільноти, оскільки, наприклад, деякі види пробіотиків підвищують стійкість організму тварин до колонізації патогенами, а також на їх знищення. *Bacillus megaterium* найбільшій за розміром із родини *Bacillus*. *B. megaterium* розмножуючись створює специфічне середовище, покращує мікрофлору рубця. Крім того, *B. megaterium* знищує патогенні мікроорганізми за рахунок продукції високоспецифічного протимікробного білка – мегацину.

За результатами проведеного дослідження встановлено, що *S. aureus* був виділений у 22 % дослідних зразків молока корів, хворих на субклінічний мастит. Соматичні клітини молока здорової корови представлені в основному епітеліальними клітинами, поодинокими сегментоядерними нейтрофілами, моноцитами та базофілами. У молоці хворих на субклінічний мастит корів спостерігається збільшення в декілька разів епітеліальних клітин,

лімфоцитів, базофілів; нейтрофілів та моноцитів.

Дослідженнями встановлено, що в процесі розвитку запалення вимені у молоці корів одночасно збільшується кількість соматичних клітин та мікроорганізмів і зменшується молоковіддача. Також продуктивність корів зменшується у перехідний зимово-весняний період через зміну корму та кліматичних умов. Лікування хворих на субклінічний мастит корів пробіотичним штамом *B. megaterium* NCH 55 дало можливість збільшити продуктивність у 70 % корів та поліпшити якість молока до гатунку «Екстра».

За результатами проведених досліджень запропонована схема застосування *B. megaterium* NCH 55 для молочних корів для лікування та профілактики субклінічного маститу з використанням комплексного підходу.

Дослідженнями доведено, що застосування *Bacillus megaterium* у дозі 15 г тваринам протягом 30 діб сприяло зменшенню мікрофлори в молоці на 18 % та кількості соматичних клітин на 33,5 %, порівняно до початку лікування. При збільшенні дози *B. megaterium* до 25 г корові відбувалось зменшення кМАФАНМ та КСК на 21,2 % та 58,2 % відповідно, порівняно до початку дослідження. Повернення показників молока до класу екстра відбувалось при задаванні тваринам *B. megaterium* у дозі 35 г протягом місяця. При цьому кількість мікрофлори у дослідному молоці зменшилась на 40,2 %, а кількість соматичних клітин на 87,9 %. Важливим результатом є ефективне лікування корів від субклінічного маститу без застосування антимікробних засобів, а також покращення мікробіоти шлунково-кишкового тракту.

ВИСНОВКИ

У дисертаційному дослідженні розроблена та запропонована схема застосування альтернативного методу лікування субклінічного маститу у корів на основі пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* NCH 55 з використанням комплексного підходу. Вперше експериментально доведена терапевтична ефективність застосування *B. megaterium* NCH 55 при субклінічному маститі, встановлений позитивний вплив на мікробіоту шлунково-кишкового тракту та відновлення молочної продуктивності; визначено етіологію виникнення субклінічного маститу у корів в господарствах, встановлено основних збудників маститу; досліджені властивості штаму *B. megaterium* NCH 55 і можливості його застосування для тварин.

1. Доведено, що штам *Bacillus megaterium* NCH 55 є авірулентним непатогенним мікроорганізмом, що належить до I групи ризику: «відсутній або дуже низький індивідуальний і суспільний ризик» $LD_{50\text{ per os}} > 8 \times 10^9$, $LD_{50} > 1 \times 10^9$.

2. Встановлено, що тестові штами мікроорганізмів *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* K12 NCTC 10538, *S. typhimurium* ATCC 29630, *Candida albicans* ATCC були чутливі до *B. megaterium* NCH 55. У розведенні 1×10^9 , КУО/г *B. megaterium* NCH 55 проявляв максимальні антагоністичні властивості у вигляді зони затримки росту відносно всіх виділених ізолятів збудників маститу: *S. agalactiae* – на 12,2 %; *S. aureus* – на 10,5 %; *S. epidermidis* – на 16,3 %; *E. fecalis* – на 19,6 %; *E. coli* – на 8,9 %; *Candida* – на 22,62 %.

3. Мікроскопічними дослідженнями встановлено, що бактерії *B. megaterium* NCH 55 здатні утворювати ендоспори; використовують лактозу та глюкозу як джерела вуглецю; не ферментують індол, рамнозу, арабінозу, сорбіт, але здатні утворювати сечовину, виробляють ферменти мальтазу, целюлазу, амілазу. Індекс адгезійності еритроцитів (ІАЕ) складав $2,0 \pm 0,11$, що

відповідно до класифікації Бріліс вважається показником низької адгезії. Середній показник адгезії (СПА) складав $1,70 \pm 0,09$ при коефіцієнті участі еритроцитів в адгезійному процесі (КУЕ) – $84,25 \pm 2,53$.

5. Експериментально встановлено, що основними збудниками субклінічного маститу у господарствах є *S. agalactiae* (20 %), *S. aureus* (17 %), *S. epidermidis* (15 %), *E. fecalis* (12 %), *E. coli* (10 %), *Mycoplasma spp.* (8 %), гриби *Candida* (7 %) та асоційована мікрофлора (11 %).

6. Доведено, що в першу лактацію у корів спостерігали збільшення КСК на сьому добу захворювання на 87,4 %; на десяту – на 143,0 %; на п'ятнадцяту – на 17,0 %, порівняно до початку хвороби. У корів другої лактації також прослідковується тенденція збільшення запалення вим'я на сьому добу на 78,2 %; на десяту – на 142 %; на п'ятнадцяту – на 8,0 %. Дослідженнями було встановлено, що кількість соматичних клітин (КСК) позитивно корелюється із патогенністю збудника маститу та кМАФАНМ.

7. Дослідженнями встановлений позитивний вплив *Bacillus megaterium* NCH 55 (1×10^9 КУО/г) в дозі 35 г на тварину на мікрофлору шлунково-кишкового тракту корів, де кількість *Lactobacillus sp.* збільшилась на 67 % та *Bifidobacterium* на 58 %. Рівень умовно-патогенної мікрофлори зменшився *Escherichia coli* – на 45 %, *Clostridium* – на 27 %, *Enterobacteriaceae* та *Staphylococcus* – на 75 %, *Candida* – на 80 %, порівняно до контролю.

8. Встановлено, що рівень метаболітів у хворих корів по закінченню періоду лікування був менше АСТ на 53,69 % та АЛТ на – 51,33 %, порівняно до початку дослідження за використання *Bacillus megaterium* NCH 55.

9. Виробничими дослідженнями встановлено, що у 70 % корів, які на 30 добу досліджень досягли продуктивності більше 30 кг/добу показники молока такі як кількість соматичних клітин ($КСК \leq 400$ тис/см³) та кМАФАНМ (≤ 100 тис.КУО/см³) відповідали класу «Екстра».

10. За результатами проведених досліджень була розроблена схема

застосування *Bacillus megaterium* NCH 55. Доведено, що за застосування *Bacillus megaterium* у дозі 15 г тваринам протягом 30 діб сприяло зменшенню кМАФАнМ в молоці на 18 % та КСК на – 33,5 %; у дозі 25 г відбувалось зменшення кМАФАнМ на 21,2 % та КСК на – 58,2 %, у дозі 35 г протягом місяця зменшення кМАФАнМ на 40,2 % та КСК на 87,9 %, молоко відповідало гатунку «Екстра».

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. У господарствах молочного спрямування лактуючим коровам та сухостійного періоду рекомендується застосовувати *Bacillus megaterium* NCH 55 у концентрації 1×10^9 КУО/г в дозі 35 г на тварину для лікування субклінічного маститу та супутніх захворювань шлунково-кишкового тракту.

2. За результатами дисертаційної роботи розроблені методичні рекомендації «Розробка альтернативних методів лікування дійних корів за субклінічного маститу», затверджені Вченою радою СНАУ, протокол № 12, від 25.04.2022 року.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Влізло, В.В. (2012) Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник. Львів, СПОЛОМ, 764 с.
2. Гаркавенко, Т.О., Горбатюк, О.І., Козицька, Т.Г., Анріяшук, В.О., Гаркавенко, В.М., Дибкова, С.М., Азиркіна І.М. (2021) Методичні рекомендації з визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, К.:ДНДІЛВСЕ, 101.
3. ДСТУ 3662-97. Молоко коров'яче незбиране. Вимоги при закупівлі. Київ, 1997. 13 с.
4. ДСТУ 7357:2013 «Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання»
http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=84675
5. Кожемякин Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. МОЗУ, Фармкомітет. Київ- 2002. 156 С.
6. Левченко, В.І. Влізло, В.В., Кондрахін, І.П., Головаха, В.І., Морозенко, Д.В., Сахнюк, В.В., Слівінська, Л.Г., Чумаченко, В.В., Цвіліховський, М.І., Безух, В.М., Богатко, Л.М., Вовкотруб, Н.В., Мельник А.Ю., Москаленко, В.П., Піддубняк, О.В., Сулова, Н.І., Тишківський, М.Я., Улизько, С.І., Щуревич, Г.О. (2017) Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин. Біла Церква, 544 с.
7. Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсико-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів. Методичні вказівки МОЗ України. Київ, 2004.
8. Abboud, M., El Rammouz, R., Jammal, B., & Sleiman, M. (2015). In vitro and in vivo antimicrobial activity of two essential oils *Thymus vulgaris* and

Lavandula angustifolia against bovine *Staphylococcus* and *Streptococcus* mastitis pathogen. *Middle East J. Agric. Res*, 4, 975-983.

9. Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC veterinary research*, 12(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>
10. Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N.B., Galvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Micr Rev.* 35, 201-232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>.
11. Aebi, M., van den Borne, B. H., Raemy, A., Steiner, A., Pilo, P., & Bodmer, M. (2015). *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. *Acta veterinaria Scandinavica*, 57(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0099-x>
12. Aghamohammadi, M., Haine, D., Kelton, D. F., Barkema, H. W., Hogeveen, H., Keefe, G. P., & Dufour, S. (2018). Herd-Level Mastitis-Associated Costs on Canadian Dairy Farms. *Frontiers in veterinary science*, 5, 100. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00100>
13. Akhtar, M., Guo, S., Guo, Y. F., Zahoor, A., Shaukat, A., Chen, Y., Umar, T., Deng, P. G., & Guo, M. (2020). Upregulated-gene expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) via TLRs following NF- κ B and MAPKs in bovine mastitis. *Acta tropica*, 207, 105458. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105458>
14. Al-Farha, A. A., Hemmatzadeh, F., Khazandi, M., Hoare, A., & Petrovski, K. (2017). Evaluation of effects of *Mycoplasma* mastitis on milk composition in dairy cattle from South Australia. *BMC veterinary research*, 13(1), 351. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1274-2>
15. Alluwaimi A. M. (2004). The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Research in veterinary science*, 77(3), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.04.006>

16. Anderson, K. L., Wesen, D. P., & Fetrow, J. (1991). Influence of inoculum volume in diagnosis of environmental mastitis from clinical quarters. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 3(2), 165–167. <https://doi.org/10.1177/104063879100300212>
17. Andrews, T., Neher, D. A., Weicht, T. R., & Barlow, J. W. (2019). Mammary microbiome of lactating organic dairy cows varies by time, tissue site, and infection status. *PloS one*, 14(11), e0225001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225001>
18. Andriani, Y. (2015). Assessment on cow rumen fluid celluloseamylase enzyme activity as an alternative source of crude fiber degrading enzyme in fish feed materials. *Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice-Seria Zootehnie*, 63, 242-245.
19. Andriani, Y., Rochima, E., Safitri, R., & Rahayuningsih, S. R. (2017). Characterization of *Bacillus megaterium* and *Bacillus mycoides* Bacteria as Probiotic Bacteria in Fish and Shrimp Feed. *KnE Life Sciences*, 2(6), 127-135. <https://doi.org/10.18502/kls.v2i6.1029>
20. Angelopoulou, A., Warda, A. K., Hill, C., & Ross, R. P. (2019). Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis - live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins. *Critical reviews in microbiology*, 45(5-6), 564–580. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1648381>
21. Antanaitis, R., Juozaitienė, V., Jonike, V., Baumgartner, W., & Paulauskas, A. (2021). Milk Lactose as a Biomarker of Subclinical Mastitis in Dairy Cows. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(6), 1736. <https://doi.org/10.3390/ani11061736>
22. Ashraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical animal health and production*, 50(6), 1193–1202. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1629-0>

23. Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal health research reviews*, 21(1), 36–49. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>
24. Babra, C., Tiwari, J. G., Pier, G., Thein, T. H., Sunagar, R., Sundareshan, S., Isloor, S., Hegde, N. R., de Wet, S., Deighton, M., Gibson, J., Costantino, P., Wetherall, J., & Mukkur, T. (2013). The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia microbiologica*, 58(6), 469–474. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0232-z>
25. Bannerman D. D. (2009). Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of animal science*, 87(13 Suppl), 10–25. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1187>
26. Bardhan D. (2013). Estimates of economic losses due to clinical mastitis in organized dairy farms. *Indian J Dairy Sci*. 66:168–172. <https://doi.org/10.21887/ijvsbt.v13i01.8732>
27. Barth, K. (2008). EC and CMT detect subclinical mastitis in dairy sheep but less sensitive than in dairy cows. https://literatur.thuenen.de/digbib_extern/bitv/dk039993.pdf
28. Bennett, R., Christiansen, K., & Clifton-Hadley, R. (1999). Preliminary estimates of the direct costs associated with endemic diseases of livestock in Great Britain. *Preventive veterinary medicine*, 39(3), 155–171. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(99\)00003-3](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(99)00003-3)
29. Bhutto, A. L., Murray, R. D., & Woldehiwet, Z. (2012). California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Research in veterinary science*, 92(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.006>

30. Bobbo, T., Ruegg, P. L., Stocco, G., Fiore, E., Giancesella, M., Morgante, M., Pasotto, D., Bittante, G., & Cecchinato, A. (2017). Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. *Journal of dairy science*, 100(6), 4868–4883. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12353>
31. Bochniarz, M., Zdzisińska, B., Wawron, W., Szczubiał, M., & Dąbrowski, R. (2017). Milk and serum IL-4, IL-6, IL-10, and amyloid A concentrations in cows with subclinical mastitis caused by coagulase-negative staphylococci. *Journal of dairy science*, 100(12), 9674–9680. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13552>
32. Bogatko, N., Bukalova, N., Lyasota, V., Artemenko, L., Bogatko, L., I. Bakhur, T., Prilipko, T., Zabarna, I., Savchuk, L., & Tkachuk, S. (2019). SOME INDICESâ€™™ DETERMINATION OF RAW AND PASTEURIZED COW MILK BY UKRAINIAN MANUFACTURERS USING UNIQUE EXPRESS METHODS. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(1), 9–14. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.1.9-14>
33. Boireau, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Calavas, D., Madec, J. Y., Leblond, A., Haenni, M., & Gay, É. (2018). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006-2016. *Journal of dairy science*, 101(10), 9451–9462. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14835>
34. Bradley, A. J., Breen, J. E., Payne, B., White, V., & Green, M. J. (2015). An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. *Journal of dairy science*, 98(3), 1706–1720. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8332>
35. Brilis, V.I., Brilene, T.A., Lentsener, Kh.P., Lentsener, A.A. (1986) Methodology for studying the adhesive process of microorganisms, Laboratory work. №4, C. 210-212 <https://core.ac.uk/download/pdf/14485721.pdf>

36. Caixeta, L. S., & Omontese, B. O. (2021). Monitoring and Improving the Metabolic Health of Dairy Cows during the Transition Period. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(2), 352. <https://doi.org/10.3390/ani11020352>
37. Chakraborty, S., Dhama, K., Tiwari, R., Iqbal Yattoo, M., Khurana, S. K., Khandia, R., Munjal, A., Munuswamy, P., Kumar, M. A., Singh, M., Singh, R., Gupta, V. K., & Chaicumpa, W. (2019). Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population-a review. *The veterinary quarterly*, 39(1), 76–94. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1642546>
38. Cheng W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33(11), 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
39. Clemente, J. C., Manasson, J., & Scher, J. U. (2018). The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *BMJ (Clinical research ed.)*, 360, j5145. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5145>
40. Collado, R., Prenafeta, A., González-González, L., Pérez-Pons, J. A., & Sitjà, M. (2016). Probing vaccine antigens against bovine mastitis caused by *Streptococcus uberis*. *Vaccine*, 34(33), 3848–3854. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.044>
41. Commins, S. P., Borish, L., & Steinke, J. W. (2010). Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S53–S72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.008>
42. Costa, A., Lopez-Villalobos, N., Sneddon, N. W., Shalloo, L., Franzoi, M., De Marchi, M., & Penasa, M. (2019). Invited review: Milk lactose- Current status and future challenges in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 102(7), 5883–5898. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15955>

43. Côté-Gravel, J., & Malouin, F. (2019). Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. *Journal of dairy science*, 102(5), 4727–4740. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15272>
44. Coulona, J. B., Gasquib, P., Barnouin, J., Ollier, A., Pradel, P., & Pomiès, D. (2002). Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Animal Research*, 51(05), 383-393.
45. Crispie, F., Alonso-Gómez, M., O'Loughlin, C., Klostermann, K., Flynn, J., Arkins, S., Meaney, W., Paul Ross, R., & Hill, C. (2008). Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *The Journal of dairy research*, 75(3), 374– 384. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003385>
46. da Silva Duarte, V., Treu, L., Sartori, C., Dias, R. S., da Silva Paes, I., Vieira, M. S., Santana, G. R., Marcondes, M. I., Giacomini, A., Corich, V., Campanaro, S., da Silva, C. C., & de Paula, S. O. (2020). Milk microbial composition of Brazilian dairy cows entering the dry period and genomic comparison between *Staphylococcus aureus* strains susceptible to the bacteriophage vB_SauM-UFV_DC4. *Scientific reports*, 10(1), 5520. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62499-6>
47. Das, D, Panda, S.K., Jena, B., Sahoo, A.K. (2018). Economic impact of subclinical and clinical mastitis in Odisha, India. *IntJCurrMicrobiolAppSci*. 7(03):3651–3654. <https://www.ijcmas.com/7-3-2018/D.%20Das2,%20et%20al.pdf>
48. De Vliegher, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S., & Barkema, H. W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of dairy science*, 95(3), 1025–1040. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4074>
49. Deng, Z., Hogeveen, H., Lam, T., van der Tol, R., & Koop, G. (2020). Performance of Online Somatic Cell Count Estimation in Automatic Milking

Systems. *Frontiers in veterinary science*, 7, 221.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00221>

50. Dilshad, S. R., Rehman, N. U., Ahmad, N., & Iqbal, A. (2010). Documentation of ethnoveterinary practices for mastitis in dairy animals in Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*, 30(3), 167-171.

51. Dinarello C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology*, 27, 519–550.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>

52. dos Reis, C. B., Barreiro, J. R., Moreno, J. F., Porcionato, M. A., & Santos, M. V. (2011). Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. *Journal of dairy science*, 94(9), 4406–4412.
<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3776>

53. Ezzat Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2014). The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of veterinary medicine*, 2014, 659801.
<https://doi.org/10.1155/2014/659801>

54. Ferrari, F., Cocconi, D., Bettini, R., Giordano, F., Santi, P., Tobyn, M., Price, R., Young, P., Caramella, C., & Colombo, P. (2004). The surface roughness of lactose particles can be modulated by wet-smoothing using a high-shear mixer. *AAPS PharmSciTech*, 5(4), e60. <https://doi.org/10.1208/pt050460>

55. Fonseca, I., Silva, P. V., Lange, C. C., Guimarães, M. F., Weller, M. M., Sousa, K. R., Lopes, P. S., Guimarães, J. D., & Guimarães, S. E. (2009). Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genetics and molecular biology*, 32(4), 776–781. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000074>

56. Fotina, T., Fotina, H., Ladyka, V., Ladyka, L., & Zazharska, N. (2018). Monitoring research of somatic cells count in goat milk in the eastern

region of Ukraine. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 69(3), 1101-1108. <https://doi.org/10.12681/jhvms.18882>

57. Foutz, C. A., Godden, S. M., Bender, J. B., Diez-Gonzalez, F., Akhtar, M., & Vatulin, A. (2018). Exposure to antimicrobials through the milk diet or systemic therapy is associated with a transient increase in antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* of dairy calves. *Journal of dairy science*, 101(11), 10126–10141. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14598>

58. Fox L. K. (2012). *Mycoplasma mastitis: causes, transmission, and control*. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 28(2), 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.007>

59. Garcia, S. N., Osburn, B. I., & Cullor, J. S. (2019). A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One health (Amsterdam, Netherlands)*, 7, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100086>

60. Garlanda, C., & Mantovani, A. (2013). Ligands and receptors of the interleukin-1 family in immunity and disease. *Frontiers in immunology*, 4, 396. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00396>

61. Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003–1018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>

62. Gomes, F., & Henriques, M. (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current microbiology*, 72(4), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>

63. Guccione, J., D'Andrea, L., Pesce, A., Toni, F., Borriello, G., Salzano, C., Diuccio, F., Pascale, M., & Ciaramella, P. (2020). Antibiotic dry buffalo therapy: effect of intramammary administration of benzathine cloxacillin against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy water buffalo. *BMC veterinary research*, 16(1), 191. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02410-7>

64. Haapala, V., Pohjanvirta, T., Vähäniikkilä, N., Halkilahti, J., Simonen, H., Pelkonen, S., Soveri, T., Simojoki, H., & Autio, T. (2018). Semen as a source

of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds. *Veterinary microbiology*, 216, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.005>

65. Hadrich, J. C., Wolf, C. A., Lombard, J., & Dolak, T. M. (2018). Estimating milk yield and value losses from increased somatic cell count on US dairy farms. *Journal of dairy science*, 101(4), 3588–3596. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13840>

66. Halasa T. (2012). Bioeconomic modeling of intervention against clinical mastitis caused by contagious pathogens. *Journal of dairy science*, 95(10), 5740–5749. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5470>

67. Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *The veterinary quarterly*, 29(1), 18–31. <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>

68. Hamann, J. (2001). Mastitis notes from members countries. Germany Bullt IDF367: 18-21.IDF (1987) Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. Bull IDF. 211:24. https://scholar.google.com/scholar?q=related:eDfXv8M_2tsJ:scholar.google.com/&scioq=&hl=uk&as_sdt=0,5

69. Hartung, T. (2010). Comparative analysis of the revised Directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEC – a t4 report. *ALTEX*, 27(4), 285-303. doi: 10.14573/altex.2010.4.285

70. Hartung, T. (2010). Comparative analysis of the revised Directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEC – a t4 report. *ALTEX*, 27(4), 285-303. doi: 10.14573/altex.2010.4.285

71. Hazelton, M. S., Morton, J. M., Parker, A. M., Sheehy, P. A., Bosward, K. L., Malmo, J., & House, J. K. (2020). Whole dairy herd sampling to detect subclinical intramammary *Mycoplasma bovis* infection after clinical mastitis outbreaks. *Veterinary microbiology*, 244, 108662. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108662>.

72. Heeb, L., Egholm, C., Impellizzieri, D., Ridder, F., & Boyman, O. (2018). Regulation of neutrophils in type 2 immune responses. *Current opinion in immunology*, 54, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.06.009>
73. Hogeveen, H., Pyorala, S., Waller, K. P., Hogan, J. S., Lam, T. J., Oliver, S. P., & Hillerton, J. E. (2011). Current status and future challenges in mastitis research. In Proceedings of the 50th Annual Meeting of the National Mastitis Council, 23-26 January, 2011, Arlington, USA (pp. 36-48).
74. Hogeveen, H., Steeneveld, W., & Wolf, C. A. (2019). Production diseases reduce the efficiency of dairy production: A review of the results, methods, and approaches regarding the economics of mastitis. *Annual Review of Resource Economics*, 11, 289-312. doi: 10.1146/annurev-resource-100518-09395
75. Holko, I., Tančin, V., Vršková, M., & Tvarožková, K. (2019). Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. *The Journal of dairy research*, 86(4), 436–439. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000694>
76. Hoque, M. N., Das, Z. C., Rahman, A., & Hoque, M. M. (2016). Effect of administration of vitamin E, selenium and antimicrobial therapy on incidence of mastitis, productive and reproductive performances in dairy cows. *International journal of veterinary science and medicine*, 4(2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2016.11.001>
77. Horiuk, Y. V., Kukhtyn, M. D., Horiuk, V. V., Sytnik, V. A., Dashkovskyy, O. O. (2021). Effect of Phage SAvB14 combined with antibiotics on *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12 (3), 531–536. <https://doi.org/10.15421/022173>
78. Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Kernychnyi, S., Tarasenko, L. (2020). Characteristics of bacteriophages of the *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Veterinárni Medicína*, 65 (10), 421–426. <https://doi.org/10.17221/55/2020-VETMED>

79. Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Kernychnyi, S., Laiter-Moskaliuk, S., Prosyanyi, S., Boltyk, N. (2021). Sensitivity of *Staphylococcus aureus* cultures of different biological origin to commercial bacteriophages and phages of *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Veterinary World*, 14 (6), 1588–1593. [www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.1588-1593](https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1588-1593)
80. Horwood, P. F., Schibrowski, M. I., Fowler, E. V., Gibson, J. S., Barnes, T. S., & Mahony, T. J. (2014). Is *Mycoplasma bovis* a missing component of the bovine respiratory disease complex in Australia?. *Australian veterinary journal*, 92(6), 185–191. <https://doi.org/10.1111/avj.12184>
81. Hussein, H. A., El-Razik, K., Gomaa, A. M., Elbayoumy, M. K., Abdelrahman, K. A., & Hosein, H. I. (2018). Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Veterinary world*, 11(1), 34–41. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.34-41>
82. Ianieva, O. D., Voronina, G. O., & Pidgorskyi, V. S. (2013). Isolation and characteristics of the lactose-fermenting yeasts *Candida kefyr*. *Cytology and genetics*, 47(6), 359-365.
83. Ivashkiv L. B. (2018). IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 18(9), 545–558. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>
84. Jagielski, T., Krukowski, H., Bochniarz, M., Piech, T., Roeske, K., Bakula, Z., Wlazlo, L., & Woch, P. (2019). Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland - a cross-country study. *Microbial biotechnology*, 12(3), 556–566. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13394>
85. Jagielski, T., Roeske, K., Bakula, Z., Piech, T., Wlazlo, L., Bochniarz, M., Woch, P., & Krukowski, H. (2019). A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. *Journal of dairy science*, 102(1), 619–628. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15495>
86. Jasper D. E. (1982). The role of *Mycoplasma* in bovine mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181(2), 158–162.

87. Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., & Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *The British journal of nutrition*, 110(7), 1253–1262. <https://doi.org/10.1017/S0007114513000597>
88. Junttila, I. S., Watson, C., Kummola, L., Chen, X., Hu-Li, J., Guo, L., Yagi, R., & Paul, W. E. (2013). Efficient cytokine-induced IL-13 production by mast cells requires both IL-33 and IL-3. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 132(3), 704–712.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.03.033>
89. Kalińska, A., Jaworski, S., Wierzbicki, M., & Gołębiewski, M. (2019). Silver and Copper Nanoparticles-An Alternative in Future Mastitis Treatment and Prevention?. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1672. <https://doi.org/10.3390/ijms20071672>
90. Kalliolias, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews. Rheumatology*, 12(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>
91. Kandeel, S. A., Morin, D. E., Calloway, C. D., & Constable, P. D. (2018). Association of California Mastitis Test Scores with Intramammary Infection Status in Lactating Dairy Cows Admitted to a Veterinary Teaching Hospital. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(1), 497–505. <https://doi.org/10.1111/jvim.14876>
92. Karo-Atar, D., Bitton, A., Benhar, I., & Munitz, A. (2018). Therapeutic Targeting of the Interleukin-4/Interleukin-13 Signaling Pathway: In Allergy and Beyond. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 32(3), 201–220. <https://doi.org/10.1007/s40259-018-0280-7>
93. Karpun, Ye, Parchenko, V, Fotina, T, Demianenko, D, Fotin, A, Nahorny, V, Nahorna, N (2021) The investigation of antimicrobial activity of some s-substituted bis-1,2,4-triazole-3-thiones. *Pharmacia* 68(4): 797-804. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.68.e65761>

94. Kaur, S., Bansal, Y., Kumar, R., & Bansal, G. (2020). A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 28(5), 115327. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115327>
95. Kayano, M., Itoh, M., Kusaba, N., Hayashiguchi, O., Kida, K., Tanaka, Y., Kawamoto, K., & Gröhn, Y. T. (2018). Associations of the first occurrence of pathogen-specific clinical mastitis with milk yield and milk composition in dairy cows. *The Journal of dairy research*, 85(3), 309–316. <https://doi.org/10.1017/S0022029918000456>
96. Khasapane, N. G., Nkhebenyane, J. S., Kwenda, S., Khumalo, Z., Mtshali, P. S., Taioe, M. O., & Thekiso, O. (2021). Application of culture, PCR, and PacBio sequencing for determination of microbial composition of milk from subclinical mastitis dairy cows of smallholder farms. *Open life sciences*, 16(1), 800–808. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0080>
97. Kibebew, K. (2017). Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *J Biol Agric Healthc*, 7(2), 1-14.
98. Kim, B. S., Park, Y. J., & Chung, Y. (2016). Targeting IL-17 in autoimmunity and inflammation. *Archives of pharmacal research*, 39(11), 1537–1547. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0823-8>, Chen, K., & Kolls, J. K. (2017). Interleukin-17A (IL17A). *Gene*, 614, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.01.016>
99. Kitching, M., Mathur, H., Flynn, J., Byrne, N., Dillon, P., Sayers, R., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P. (2019). A Live Bio-Therapeutic for Mastitis, Containing *Lactococcus lactis* DPC3147 With Comparable Efficacy to Antibiotic Treatment. *Frontiers in microbiology*, 10, 2220. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02220>
100. Klaas, I. C., & Zadoks, R. N. (2018). An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and emerging diseases*, 65 Suppl 1, 166–185. <https://doi.org/10.1111/tbed.12704>

101. Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W. J., Paul Ross, R., & Hill, C. (2010). Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *The Journal of dairy research*, 77(2), 231–238. <https://doi.org/10.1017/S0022029909990239>
102. Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R. P., Hill, C., & Meaney, W. (2008). Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *The Journal of dairy research*, 75(3), 365–373. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003373>
103. Krishnamoorthy, P., Suresh, K. P., Jayamma, K. S., Shome, B. R., Patil, S. S., & Amachawadi, R. G. (2021). An Understanding of the Global Status of Major Bacterial Pathogens of Milk Concerning Bovine Mastitis: A Systematic Review and Meta-Analysis (Scientometrics). *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(5), 545. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050545>
104. Krömker, V., & Leimbach, S. (2017). Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 52 Suppl 3, 21–29. <https://doi.org/10.1111/rda.13032>
105. Lemosquet, S., Delamaire, E., Lapierre, H., Blum, J. W., & Peyraud, J. L. (2009). Effects of glucose, propionic acid, and nonessential amino acids on glucose metabolism and milk yield in Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, 92(7), 3244–3257. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1610>
106. Ma, C., Sun, Z., Zeng, B., Huang, S., Zhao, J., Zhang, Y., Su, X., Xu, J., Wei, H., & Zhang, H. (2018). Cow-to-mouse fecal transplantations suggest intestinal microbiome as one cause of mastitis. *Microbiome*, 6(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0578-1>
107. Maia, N. L., de Barros, M., de Oliveira, L. L., Cardoso, S. A., Dos Santos, M. H., Pieri, F. A., Ramalho, T. C., da Cunha, E., & Moreira, M. (2018). Synergism of Plant Compound With Traditional Antimicrobials Against

Streptococcus spp. Isolated From Bovine Mastitis. *Frontiers in microbiology*, 9, 1203. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01203>

108. Malinowski, E., Lassa, H., Kłossowska, A., Smulski, S., Markiewicz, H., & Kaczmarowski, M. (2006). Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland. *Polish journal of veterinary sciences*, 9(3), 191–194.

109. Malvisi, M., Stuknytė, M., Magro, G., Minozzi, G., Giardini, A., De Noni, I., & Piccinini, R. (2016). Antibacterial activity and immunomodulatory effects on a bovine mammary epithelial cell line exerted by nisin A-producing *Lactococcus lactis* strains. *Journal of dairy science*, 99(3), 2288–2296. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10161>

110. Manso-Silván, L., Dupuy, V., Lysnyansky, I., Ozdemir, U., & Thiaucourt, F. (2012). Phylogeny and molecular typing of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by multilocus sequencing. *Veterinary microbiology*, 161(1-2), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.015>

111. Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4), 795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>

112. Miglior, F., Sewalem, A., Jamrozik, J., Bohmanova, J., Lefebvre, D. M., & Moore, R. K. (2007). Genetic analysis of milk urea nitrogen and lactose and their relationships with other production traits in Canadian Holstein cattle. *Journal of dairy science*, 90(5), 2468–2479. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-487>

113. Modin, A. N. (2010). Prevention of mastitis in cows during the dry period. *Zootekhniya [Zootechnics]*, (10), 27-28.

114. Murphy, M. P., Niedziela, D. A., Leonard, F. C., & Keane, O. M. (2019). The in vitro host cell immune response to bovine-adapted *Staphylococcus aureus* varies according to bacterial lineage. *Scientific reports*, 9(1), 6134. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42424-2>

115. Naqvi, S. A., De Buck, J., Dufour, S., & Barkema, H. W. (2018). Udder health in Canadian dairy heifers during early lactation. *Journal of dairy science*, 101(4), 3233–3247. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13579>
116. Nyman, A. K., Ekman, T., Emanuelson, U., Gustafsson, A. H., Holtenius, K., Waller, K. P., & Sandgren, C. H. (2007). Risk factors associated with the incidence of veterinary-treated clinical mastitis in Swedish dairy herds with a high milk yield and a low prevalence of subclinical mastitis. *Preventive veterinary medicine*, 78(2), 142–160. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.10.002>
117. O'Halloran, F., Beecher, C., Chaurin, V., Sweeney, T., & Giblin, L. (2016). Lactoferrin affects the adherence and invasion of *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* in mammary epithelial cells. *Journal of dairy science*, 99(6), 4619–4628. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10465>
118. Olde Riekerink, R. G., Barkema, H. W., Kelton, D. F., & Scholl, D. T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of dairy science*, 91(4), 1366–1377. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0757>
119. Oliver, S. P., & Murinda, S. E. (2012). Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 28(2), 165–185. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.005>
120. Paliy, A., Aliiev, E., Nanka, A., Bogomolov, O., Bredixin, V., Paliy, A., Shkromada, O., Musiienko, Y., Stockiy, A., & Grebenik, N. (2021). Identifying changes in the technical parameters of milking rubber under industrial conditions to elucidate their effect on the milking process. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 3(1 (111)), 21–29. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2021.231917>
121. Paliy, A., Aliiev, E., Paliy, A., Ishchenko, K., Shkromada, O., Musiienko, Y., Plyuta, L., Chekan, O., Dubin, R., & Mohutova, V. (2021). Development of a device for cleansing cow udder teats and testing it under

industrial conditions. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 1(1 (109), 43–53. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2021.224927>

122. Park, Y. K., Fox, L. K., Hancock, D. D., McMahan, W., & Park, Y. H. (2012). Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. *Journal of veterinary science*, 13(1), 103–105. <https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.1.103>

123. Parker, A. M., Sheehy, P. A., Hazelton, M. S., Bosward, K. L., & House, J. K. (2018). A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(3), 1241–1252. <https://doi.org/10.1111/jvim.15135>

124. Pașca, C., Mărghițaș, L. A., Dezmirean, D. S., Matei, I. A., Bonta, V., Pașca, I., Chirilă, F., Cîmpean, A., & Iosif Fiț, N. (2020). Efficacy of Natural Formulations in Bovine Mastitis Pathology: Alternative Solution to Antibiotic Treatment. *Journal of veterinary research*, 64(4), 523–529. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0067>

125. Pedersen, R. R., Krömker, V., Bjarnsholt, T., Dahl-Pedersen, K., Buhl, R., & Jørgensen, E. (2021). Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Frontiers in veterinary science*, 8, 656810. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656810>

126. Piotrowska-Tomala, K. K., Siemieniuch, M. J., Szóstek, A. Z., Korzekwa, A. J., Woclawek-Potocka, I., Galvão, A. M., Okuda, K., & Skarzynski, D. J. (2012). Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland epithelial cells. *Domestic animal endocrinology*, 43(4), 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2012.04.005>

127. Pollott G. E. (2004). Deconstructing milk yield and composition during lactation using biologically based lactation models. *Journal of dairy science*, 87(8), 2375–2387. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73359-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73359-7)

128. Prescott SC, Breed RS (2010): *The determination of the number of body cells in milk by a direct method*. American J Pub Hyg, 20, 662-640. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19599514/>
129. Ptak, E., Brzozowski, P., & Bieniek, J. (2012). Genetic parameters for lactose percentage in the milk of Polish Holstein-Friesians. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 21(2), 251-262.
130. Pyörälä S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary research*, 34(5), 565–578. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003026>
131. Reist, M., Erdin, D., von Euw, D., Tschuemperlin, K., Leuenberger, H., Chilliard, Y., Hammon, H. M., Morel, C., Philipona, C., Zbinden, Y., Kuenzi, N., & Blum, J. W. (2002). Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. *Journal of dairy science*, 85(12), 3314–3327. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74420-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74420-2),
132. Rohmeier, L., Petzl, W., Koy, M., Eickhoff, T., Hülsebusch, A., Jander, S., Macias, L., Heimes, A., Engelmann, S., Hoedemaker, M., Seyfert, H. M., Kühn, C., Schuberth, H. J., Zerbe, H., & Meyerholz, M. M. (2020). In vivo model to study the impact of genetic variation on clinical outcome of mastitis in uniparous dairy cows. *BMC veterinary research*, 16(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2251-8>
133. Romero, J., Benavides, E., & Meza, C. (2018). Assessing Financial Impacts of Subclinical Mastitis on Colombian Dairy Farms. *Frontiers in veterinary science*, 5, 273. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00273>
134. Roussel, P., Cunha, P., Porcherie, A., Petzl, W., Gilbert, F. B., Riollot, C., Zerbe, H., Rainard, P., & Germon, P. (2015). Investigating the contribution of IL-17A and IL-17F to the host response during *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary research*, 46(1), 56. [https://doi.org/10.1186/s13567-015-0201-](https://doi.org/10.1186/s13567-015-0201-4)

135. Ruegg P. L. (2009). Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *Journal of animal science*, 87(13 Suppl), 43–55.
<https://doi.org/10.2527/jas.2008-1217>
136. Ruegg P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of dairy science*, 100(12), 10381–10397.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
137. Sepúlveda-Varas, P., Proudfoot, K. L., Weary, D. M., & von Keyserlingk, M. A. (2016). Changes in behaviour of dairy cows with clinical mastitis. *Applied Animal Behaviour Science*, 175, 8-13.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.09.022>
138. Shah, K. N., Valand, P., Nauriyal, D. S., & Joshi, C. G. (2018). Immunomodulation of IL-1, IL-6 and IL-8 cytokines by *Prosopis juliflora* alkaloids during bovine sub-clinical mastitis. *3 Biotech*, 8(10), 409.
<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1438-1>
139. Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yattoo, M., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K. P., & Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *The veterinary quarterly*, 41(1), 107–136.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
140. Shively, C. A., Register, T. C., Appt, S. E., Clarkson, T. B., Uberseder, B., Clear, K., Wilson, A. S., Chiba, A., Tooze, J. A., & Cook, K. L. (2018). Consumption of Mediterranean versus Western Diet Leads to Distinct Mammary Gland Microbiome Populations. *Cell reports*, 25(1), 47–56.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.078>
141. Shkromada O., Skliar O., Paliy A., Ulko L., Gerun I., Naumenko O., Ishchenko K., Kysterna O., Musiienko O., Paliy A., 2019. Development of measures to improve milk quality and safety during production. *Eastern-European*

Journal of Enterprise Technologies, 3/11(99), 30-39.
<https://doi.org/10.15587/1729-4061.2019.168762>

142. Shkromada O., Skliar O., Pikhtirova A., Gerun I. (2019) Pathogens Transmission and Cytological Composition of Cow's Milk // *Acta Vet Eurasia* № 45. P. 73-79 <https://doi.org/10.26650/actavet.2019.19004>

143. Shkromada, O., Palii, A., Palii, A., Skliar, O., Dudchenko, Y., & Necherya, T. (2019). Improvement of milk quality for micro-climate formation on cattle farms. *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The Series: Veterinary Medicine*, (4 (47), 43-49. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2019.4.7>

144. Sinha, M. K., Thombare, N. N., & Mondal, B. (2014). Subclinical mastitis in dairy animals: incidence, economics, and predisposing factors. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 523984. <https://doi.org/10.1155/2014/523984>

145. Skowron, K., Sękowska, A., Kaczmarek, A., Grudlewska, K., Budzyńska, A., Białucha, A., & Gospodarek-Komkowska, E. (2019). Comparison of the effectiveness of dipping agents on bacteria causing mastitis in cattle. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 26(1), 39–45. <https://doi.org/10.26444/aaem/82626>

146. Smulski, S., Gehrke, M., Libera, K., Cieslak, A., Huang, H., Patra, A. K., & Szumacher-Strabel, M. (2020). Effects of various mastitis treatments on the reproductive performance of cows. *BMC veterinary research*, 16(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02305-7>

147. Souza, R., Rault, L., Seyffert, N., Azevedo, V., Le Loir, Y., & Even, S. (2018). *Lactobacillus casei* BL23 modulates the innate immune response in *Staphylococcus aureus*-stimulated bovine mammary epithelial cells. *Beneficial microbes*, 9(6), 985–995. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0010>

148. Steeneveld, W., van Werven, T., Barkema, H. W., & Hogeveen, H. (2011). Cow-specific treatment of clinical mastitis: an economic approach. *Journal of dairy science*, 94(1), 174–188. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3367>

149. Sztachańska, M., Barański, W., Janowski, T., Pogorzelska, J., & Zduńczyk, S. (2016). Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. *Polish journal of veterinary sciences*, 19(1), 119–124. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0015>
150. Tanih, N. F., Sekwadi, E., Ndip, R. N., & Bessong, P. O. (2015). Detection of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from cattle and pigs slaughtered in abattoirs in Vhembe District, South Africa. *TheScientificWorldJournal*, 2015, 195972. <https://doi.org/10.1155/2015/195972>
151. Televičius, M., Juozaitiene, V., Malašauskienė, D., Antanaitis, R., Rutkauskas, A., Urbutis, M., & Baumgartner, W. (2021). Inline milk lactose concentration as biomarker of the health status and reproductive success in dairy cows. *Agriculture*, 11(1), 38.
152. Tu HK Nguyen, Le B Thu. Evaluation of antimicrobial activities of *Bacillus megaterium* with a third-generation cephalosporin (ceftriaxone). *J App Pharm Sci*, 2015; 5 (09): 016-020.. 10.7324/JAPS.2015.50903
153. Twomey, D. P., Wheelock, A. I., Flynn, J., Meaney, W. J., Hill, C., & Ross, R. P. (2000). Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. *Journal of dairy science*, 83(9), 1981–1988. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75075-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75075-2)
154. Valde, J. P., Hird, D. W., Thurmond, M. C., & Osterås, O. (1997). Comparison of ketosis, clinical mastitis, somatic cell count, and reproductive performance between free stall and tie stall barns in Norwegian dairy herds with automatic feeding. *Acta veterinaria Scandinavica*, 38(2), 181–192. <https://doi.org/10.1186/BF03548498>
155. Wang L, Zhao X, Xia X, Zhu C, Qin W, Xu Y, Hang B, Sun Y, Chen S, Zhang H, Jiang J, Hu J, Fotina H, Zhang G. Antimicrobial Peptide JH-3 Effectively Kills *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain CVCC541 and Reduces Its Pathogenicity in Mice. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019

Dec;11(4):1379-1390. doi: 10.1007/s12602-019-09533-w. PMID: 31001786.
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12602-019-09533-w>

156. Wang, W., Song, Y., Petrovski, K., Eats, P., Trott, D. J., Wong, H. S., Page, S. W., Perry, J., & Garg, S. (2015). Development of intramammary delivery systems containing lasalocid for the treatment of bovine mastitis: impact of solubility improvement on safety, efficacy, and milk distribution in dairy cattle. *Drug design, development and therapy*, 9, 631–642.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S74731>

157. Wang, Y., Nan, X., Zhao, Y., Jiang, L., Wang, M., Wang, H., Zhang, F., Xue, F., Hua, D., Liu, J., Yao, J., & Xiong, B. (2021). Rumen microbiome structure and metabolites activity in dairy cows with clinical and subclinical mastitis. *Journal of animal science and biotechnology*, 12(1), 36.
<https://doi.org/10.1186/s40104-020-00543-1>

158. Wenz, J. R., Fox, L. K., Muller, F. J., Rinaldi, M., Zeng, R., & Bannerman, D. D. (2010). Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *Journal of dairy science*, 93(6), 2458–2470.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2819>

159. Wisselink, H. J., Smid, B., Plater, J., Ridley, A., Andersson, A. M., Aspán, A., Pohjanvirta, T., Vähäniikkilä, N., Larsen, H., Høgberg, J., Colin, A., & Tardy, F. (2019). A European interlaboratory trial to evaluate the performance of different PCR methods for *Mycoplasma bovis* diagnosis. *BMC veterinary research*, 15(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1819-7>

160. Xiong, W., Sun, Y., & Zeng, Z. (2018). Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environmental science and pollution research international*, 25(19), 18377–18384. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1852-2>

161. Xu, P., Fotina, H., Fotina, T., & Wang, S. (2021). *In vitro* culture and evaluation of bovine mammary epithelial cells from Ukraine dairy cows. *Iranian*

journal of veterinary research, 22(1), 65–71.
<https://doi.org/10.22099/ijvr.2020.37714.5508>

162. Xu, P., Xu, X. B., Khan, A., Fotina, T., & Wang, S. H. (2021). Antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* and content analysis of *Taraxacum Officinale* phenolic extract. *Polish journal of veterinary sciences*, 24(2), 243–251. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2021.1376590>

163. Yair, Y., Borovok, I., Mikula, I., Falk, R., Fox, L. K., Gophna, U., & Lysnyansky, I. (2020). Genomics-based epidemiology of bovine *Mycoplasma bovis* strains in Israel. *BMC genomics*, 21(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6460-0>

164. Zajác, P., Tomáška, M., Murárová, A., Čapla, J., & Čurlej, J. (2012). Quality and safety of raw cow's milk in Slovakia in 2011. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 6(2), 64–73. <https://doi.org/10.5219/189>

165. Zhang, F., Nan, X., Wang, H., Zhao, Y., Guo, Y., & Xiong, B. (2020). Effects of Propylene Glycol on Negative Energy Balance of Postpartum Dairy Cows. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10(9), 1526. <https://doi.org/10.3390/ani10091526>

166. Zhao, X., Wang, L., Zhu, C., Xia, X., Zhang, S., Wang, Y., Zhang, H., Xu, Y., Chen, S., Jiang, J., Liu, S., Wu, Y., Wu, X., Zhang, G., Bai, Y., Fotina, H., & Hu, J. (2021). The Antimicrobial Peptide Mastoparan X Protects Against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Infection, Inhibits Inflammation, and Enhances the Intestinal Epithelial Barrier. *Frontiers in microbiology*, 12, 644887. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.644887>

167. Zigo, F., Vasil', M., Ondrašovičová, S., Výrostková, J., Bujok, J., & Pecka-Kielb, E. (2021). Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. *Frontiers in veterinary science*, 8, 607311. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.607311>

ДОДАТКИ

Додаток А

Список праць, опублікованих за темою дисертації

Список праць, опублікованих за темою дисертації

Scopus:

1. Shkromada, O., Pikhtirova, A., **Tytukh, Ya.**, Baydevliatov, Yu., & Fotin, A. (2022). Treatment of subclinical mastitis of cows with probiotics. *Scientific Horizons*, 25(1), 30-40. [https://doi.org/10.48077/scihor.25\(1\).2022.30-40](https://doi.org/10.48077/scihor.25(1).2022.30-40) (Здобувач проводив збір та аналіз первинних даних, інтерпретацію результатів).

Наукові праці опубліковані в виданнях країн ЕС:

2. **Tytukh, Y.**, Musiienko, Y., & Grebenik, N. (2021). Application of bacillus megaterium for subclinical mastitis in cows. *Technology Transfer: Innovative Solutions in Medicine*, 32-34. <https://doi.org/10.21303/2585-6634.2021.002137> (Здобувач провів експериментальні дослідження, проаналізував отримані результати й оформив статтю).

Наукові праці, опубліковані у наукових фахових виданнях України:

3. Гребеник, Н. П., & **Титух, Я. В.** (2021). Визначення ефективності дії bacillus megaterium за субклінічного маститу корів. *Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин*, 22(2), 103-109. <https://doi.org/10.36359/scivp.2021-22-2.11> (Здобувач провів експериментальні дослідження, проаналізував отримані результати й оформив статтю)

4. **Титух, Я.** (2021). Моніторинг різних форм маститу у господарствах Сумської області. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*, (1 (52), 45-50. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.1.7>

5. **Титух, Я. В.** (2022). Визначення впливу збудників маститу на склад молока. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*, (2 (53), 33-38. <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.2.5>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. **Титух Я.В.** Використання пробіотиків за субклінічного маститу у корів II Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині» (м. Львів, Україна, 18-19 листопада 2021 року), С.150-151.

7. **Титух Я.В.** Причини виникнення субклінічного маститу у корів. Матеріали науково–практичної конференції викладачів, аспірантів та студентів Сумського НАУ, 19 квітня 2021 року: тези доповіді. С. 210.

8. **Титух Я.В.** Визначення впливу стану шлунково-кишкового тракту на здоров'я молочної залози. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та здобувачів освіти «Наукові здобутки у вирішенні актуальних проблем виробництва і переробки продукції тваринництва» 16 грудня 2021 року, м. Житомир, С. 134.

Методичні рекомендації

9. **Титух Я.В., Шкромада О.І. Мусієнко Ю.В.** «Розробка альтернативних методів лікування дійних корів за субклінічного маститу». Суми, 2022. 30 с. (затверджені Вченою радою СНАУ, протокол № 12, від 25.04.2022 року). *(Здобувач проаналізував результати досліджень, підготував та оформив матеріали для методичних рекомендацій).*

Додаток Б
Акт виробничого випробування

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Генеральний директор

ТОВ «Комишуватський МК»

Герман П. А.

«11» січня 2022 року



АКТ

виробничої перевірки пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* в умовах ТОВ «Комишуватський МК» с. Миколо-Комишувата, Красноградського району, Харківської області»

Ми, що нижче підписалися, ген.директор ТОВ КМК Герман П. А., к. вет. наук., доцент, кафедри акушерства та хірургії Мусієнко Ю.В.; аспірант Титух Я.В. склали даний акт про те, що в умовах дослідного господарства ТОВ «Агрофірма Лан» був випробуваний пробіотик *Bacillus megaferium*. Була визначена ефективність лікування субклінічного маститу у корів.

Всі експерименти були проведені згідно науково-дослідної роботи Сумського національного аграрного університету за темою «Вивчення патогенетичних механізмів розвитку запальної реакції, метаболічних та імунологічних процесів протидії біотичних та абіотичних факторів за акушерсько-гінекологічної та хірургічної патології в тварин» (державний реєстраційний номер 0121U107733).

Підписи:

П. А. Герман

Ю.В. Мусієнко

Я.В. Титух

ВИПРОБУВАЛЬНА ЛАБОРАТОРІЯ
ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «СМАРТБІОЛАБ»
LIMITED LIABILITY COMPANY "SMARTBIOLAB"

Р/р UA063005280000026007455029880 в ПАТ «ОТП Банк» м. Київ, Код ЄДРПОУ 40983204

Адреса юридична: 61072, Україна, м. Харків, пр. Науки, 27 Б

акредитована відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019

Атестат про акредитацію за № 201912

ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАННЯ
(біохімічні)

№ 0491/БХ від 08.07.2021 р.

Замовник ТОВ «Агрофірма Лан», Сумська обл., Сумський р-н, с. Кіндратівка,
вул. Центральна, буд. №4

(назва/прізвище/адреса)

Рахунок № 447

Дата отримання зразка 01.07.2021 р.

Назва зразка та метод випробування 7 зразків сироватки крові ВРХ, біохімічні
випробування: загальний білок – СОП-БП-02-2017; альбумін – СОП-БП-25-2018; сечовина – СОП-БП-03-2017;
неорганічний Фосфор – СОП-БП-04-2017; загальний Кальцій – СОП-БП-05-2017; загальний холестерин – СОП-БП-
07-2017; АЛТ – СОП-БП-08-2017; АСТ – СОП-БП-09-2017; Магній – СОП-БП-06-2017; Калій – СОП-БП-11-2017;
*глобуліни, *білковий коефіцієнт (А/Г), *індекс де Рітиса (АСТ/АЛТ), *Са/Р, *азот сечовини – розрахунковим
способом; *вітамін Е – СОП-БП-12-2018; *вітамін А – СОП-БП-14-2018; *вітамін D – СОП-БП-18-2018;
*неорганічні мікроелементи (*Цинк (Zn), *Купрум (Cu), *Ферум (Fe), *Манган (Mn), *Селен (Se), *Плюмбум (Pb),
*Нікель (Ni), *Стронцій (Sr), *Кобальт (Co), *Бром (Br)) – СОП-БП-15-2018

Мета випробування Визначення фізіолого-біохімічного стану тварин

Відбір зразків зразки надані замовником

Випробування проводилися 61010, м. Харків, вул. Нетіченська, 25-А, будівля І-2
(адреса)

Дата проведення випробувань 02-08.07.2021 р.

Стан зразків – непошкоджені, негемолізовані, ідентифіковані; придатні для
біохімічного дослідження

Примітка:

1. Даний протокол випробування стосується тільки зразків підданих випробуванню.
 2. Повне або часткове передрукування протоколу випробування на паперових або електронних носіях без дозволу ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» забороняється.
 3. Усі права ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» захищені згідно чинного законодавства.
 4. Дані щодо невизначеності надаються за вимогою замовника
- * – випробування поза сферою акредитації.

Особа, що затвердила протокол випробування

Директор ТОВ «СмартБіоЛаб»,

к. вет. н., с. н. с.

(посада)



В. В. Кучерявенко

(ініціали та прізвище)

Протокол випробування № 0491/БХ **від** 08.07.2021

Результати випробування

Таблиця 1. Результати біохімічних досліджень зразків сироватки крові ВРХ

Таблиця 2. Результати біохімічних досліджень зразків сироватки крові ВРХ

№ з/п	Інвентарний №	Назва параметрів, що визначаються, одиниці вимірювання							
		Заг.холестерин, ммоль/л	АСТ, од/л	АЛТ, од/л	*(АСТ/АЛТ), од	Загальний Са, ммоль/л	Неорганіч. Р, ммоль/л	*Са/Р, од	
Позначення НД на методи випробувань		СОП-БП-07-2017	СОП-БП-09-2017	СОП-БП-08-2017	Розрахунок	СОП-БП-05-2017	СОП-БП-04-2017	Розрахунок	
Контрольна група									
1	3670	5,87	80,93	30,77	2,63	2,68	2,27	1,18	
2	2570	2,91	113,29	18,74	6,05	2,92	1,92	1,52	
3	5583	4,08	108,25	24,55	4,41	2,81	2,07	1,36	
Дослідна група									
4	9832	2,50	91,67	25,37	3,61	2,47	2,29	1,08	
5	3674	5,61	147,04	33,64	4,37	2,40	2,07	1,16	
6	0982	2,03	113,37	15,19	7,46	1,86	2,00	0,93	
7	6120	1,82	90,71	17,77	5,10	2,02	2,33	0,87	
Референтні значення для корів		2,20-6,60 ²	48-108 ²	17-40 ² 20-45 ³	1,0-3,4	1,98-3,12 ^{1,2} 2,2-2,6 ³	1,50-2,90 ^{1,2} 1,2-2,4 ³	1,1-1,6	

Таблиця 3. Результати біохімічних досліджень зразків сироватки крові ВРХ

№ з/п	Інвентарний №	Назва параметрів, що визначаються, одиниці вимірювання					
		Магній, ммоль/л	Калій, ммоль/л	*Вітамін Е, мкг/мл	*Вітамін А, мкг%	*Вітамін D (25ОН), нг/мл	
Позначення НД на методи випробувань		СОП-БП-06-2017	СОП-БП-11-2017	СОП-БП-12-2018	СОП-БП-14-2018	СОП-БП-18-2020	
Контрольна група							
1	3670	1,01	4,15	3,2	44,4	22,0	
2	2570	1,12	4,33	3,4	45,1	32,5	
3	5583	1,01	4,15	3,4	44,4	36,1	
Дослідна група							
4	9832	1,08	5,01	3,8	44,2	22,5	
5	3674	0,97	4,93	3,6	44,9	20,0	
6	0982	1,08	3,71	3,1	43,7	43,0	
7	6120	1,01	4,07	3,0	46,1	55,0	
Референтні значення для корів		0,70-1,23 ^{1,2}	4,0-5,3 ²	2,0-9,0 ¹	25,0-80,0 ¹ 40,0-150,0 ¹	20-50 ¹	

Протокол випробування № 0491/БХ від 08.07.2021

Таблиця 4. Вміст неорганічних елементів в збірних пробах сироваток крові ВРХ по групах.

Назва параметрів, що визначаються, одиниці вимірювання	№ з/п зразка		Референтні значення
	Група I Контрольна (1-3)	Група II Дослідна (4-7)	
Позначення НД на методи випробувань: СОП-БП-15-2018			
*Цинк (Zn), мкг%	61,80	63,50	100,00-150,00 ¹
*Купрум (Cu), мкг%	89,00	110,00	80,00-120,00 ¹
*Ферум (Fe), мкг%	190,40	280,90	90,00-210,00 ¹
*Манган (Mn), мкг%	4,80	4,70	4,00-6,00 ¹
*Селен (Se), мкг%	5,40	6,70	7,50-10,00 ¹
*Плюмбум (Pb), мкг%	Не виявлено	Не виявлено	-
*Нікель (Ni), мг%	5,10	5,60	2,80-5,40 ¹
*Стронцій (Sr), мкг%	Не виявлено	Не виявлено	-
*Кобальт (Co), мкг%	2,60	2,30	3,00-5,00 ¹
*Бром (Br), мг%	0,78	0,82	0,70-1,30 ¹

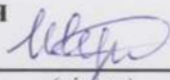
Примітки: * - випробування поза сферою акредитації відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019.

1. – Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / за ред. В.В. Влізла. – Львів : СПОЛОМ, 2012. 764 с. 2. – Мейер Д., Харви Дж. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика / пер.с англ. – М.: Софион, 2007. 456 с. 3. – G. Cozzi et.al. Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. Journal of Dairy Science Vol. 94 No. 8, 2011. 4. – F. Moore. Interpreting serum chemistry profiles in dairy cows. Vet. Med., 92 (1997), pp. 903-912.

Особа, що проводила випробування

Фахівець з якості, К. С.-Г. Н.

(посада)



(підпис)

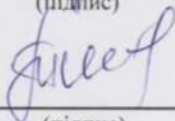
Л. В. Шуліка

(ініціали та прізвище)

Відповідальний за складання протоколу

Завідувач лабораторії

(посада)



(підпис)

Т. В. Шаповалова

(ініціали та прізвище)

тел.068-66-29-616

ВИПРОБУВАЛЬНА ЛАБОРАТОРІЯ
ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «СМАРТБІОЛАБ»
LIMITED LIABILITY COMPANY "SMARTBIOLAB"

Р/р UA063005280000026007455029880 в ПАТ «ОТП Банк» м. Київ, Код ЄДРПОУ 40983204

Адреса юридична: 61072, Україна, м. Харків, пр. Науки, 27 Б

акредитована відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019

Атестат про акредитацію за № 201912

ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАННЯ
(мікробіологічні)

№ 491/МБ від 05.07.2021 р.

Замовник ТОВ «Агрофірма Лан», Сумська обл., Сумський р-н, с. Кіндратівка,
вул. Центральна, буд. №4

(назва/прізвище/адреса)

Рахунок № 447-

Дата отримання зразка 01.07.2021р.

Назва зразка та метод випробування 4 зразки молока, *мікробіологічне
дослідження

Мета випробування Дослідження на загальне бактеріальне забруднення.

Відбір зразків зразки надано замовником

Випробування проводилися 61001, м. Харків, вул. Нетіченська, 25А, буд. И-2
(адреса)

Дата проведення випробувань від 01.07.2021 р. по 04.07.2021 р.

Стан зразків придатний для мікробіологічного дослідження

Примітка:

1. Даний протокол випробування стосується тільки зразків підданих випробуванню.
 2. Повне або часткове передрукування протоколу випробування на паперових або електронних носіях без дозволу ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» забороняється.
 3. Усі права ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» захищені згідно чинного законодавства.
 4. Дані щодо невизначеності надаються за вимогою замовника
- * – випробування поза сферою акредитації.

Особа, що затвердила протокол випробування

Директор ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб»,
К. вет. н., с. н. с.
(посада)



В. В. Кучерявенко
(ініціали та прізвище)

Протокол випробування № 0491/МБ від 05.07.2021 р.

Результати випробування

Таблиця 1. *Результати дослідження молока на загальне бактеріальне забруднення

Номер зразку	Досліджуваний матеріал	Найменування показника	Результат дослідження	Методи досліджень
Дослідна група				
491/МБ1	3674	*кМАФАнМ	16×10^2 КУО/см ³	Згідно ДСТУ 7357:2013 «Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання» *
491/МБ2	9832	*кМАФАнМ	13×10^2 КУО/см ³	
491/МБ3	6120	*кМАФАнМ	26×10^2 КУО/см ³	
491/МБ	0982	*кМАФАнМ	18×10^3 КУО/см ³	

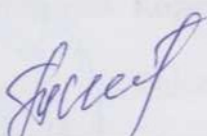
Таблиця 2. Гігієнічні критерії молока-сировини згідно з ДСТУ 3662:2018 Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови.

Назва показника, одиниця вимірювання	Норма для гатунків			Методи контролювання
	екстра	вищий	перший	
Кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (кМАФАнМ), тис. КУО/см ³	≤100	≤300	≤500	Згідно з ДСТУ 7357, ДСТУ 7089, ДСТУ ISO 4833, ДСТУ IDF 100B
Кількість соматичних клітин, тис/см ³	≤400	≤400	≤500	Згідно з ДСТУ ISO13366-1, ДСТУ ISO13366-2, ДСТУ 7672

Примітки :

* – випробування поза сферою акредитації.

Завідувач лабораторії
(посада)


(підпис)

Т. В. Шаповалова
(ініціали та прізвище)
тел. 068-66-29-616

Протокол випробування № 0491/МБ від 05.07.2021 р.

ФСУ-5.10/04 (редакція 03)

Сторінка 2 з 2

**ВИПРОБУВАЛЬНА ЛАБОРАТОРІЯ
ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «СМАРТБІОЛАБ»
LIMITED LIABILITY COMPANY "SMARTBIOLAB"**

Р/р UA063005280000026007455029880 в ПАТ «ОТП Банк» м. Київ, Код ЄДРПОУ 40983204

Адреса юридична: 61072, Україна, м. Харків, пр. Науки, 27 Б

акредитована відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019

Атестат про акредитацію за № 201912

**ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАННЯ
(молекулярно-генетичні)**

№ 0491/ПЛР від 09.07.2021 р.

Замовник ТОВ «Агрофірма Лан», Сумська обл., Сумський р-н, с. Кіндратівка,
вул. Центральна, буд. №4

(назва/прізвище/адреса)

Рахунок № 447

Дата отримання зразка 01.07.2021

Назва зразка та метод випробування біологічний матеріал від ВРХ №5,
*молекулярно-генетичні дослідження

Мета випробування дослідження на наявність ДНК та РНК збудників ІРТ, ВД,
мікоплазмосу, хламідіозу, бруцельозу, лептоспірозу

Відбір зразків зразки надані замовником

Випробування проводилися 61010, м. Харків, вул. Нетіченська, 25-А, будівля І-2
(адреса)

Дата проведення випробувань 02.07.2021 - 09.07.2021

Стан зразків зразки придатні для молекулярно-генетичного дослідження

Примітка:

1. Даний протокол випробування стосується тільки зразків підданих випробуванню.
 2. Повне або часткове передрукування протоколу випробування на паперових або електронних носіях без дозволу ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» забороняється.
 3. Усі права ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» захищені згідно чинного законодавства.
 4. Дані щодо невизначеності надаються за вимогою замовника
- * – випробування поза сферою акредитації.

Особа, що затвердила протокол випробування

Директор ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб»,

к. вет. н., с. н. с.

(посада)



В. В. Кучерявенко

(ініціали та прізвище)

Протокол випробування № 0491/ПЛР від 09.07.2021

ФСУ-5.10/05 (редакція 03)

Сторінка 1 з 2

Результати випробування

Таблиця 1. Результати молекулярно-генетичного дослідження біологічного матеріалу від ВРХ у ПЛР

№ з/п	Дослідж. матеріал	*ДНК <i>Mycoplasma spp</i>	* ДНК <i>Bovine alphaherpes-virus -1</i>	*РНК <i>Diarhea viralis bovum</i>
1	Біологічний матеріал від ВРХ (паренхіматозні органи)	Не виявлено	Не виявлено	Не виявлено

Таблиця 2. Результати молекулярно-генетичного дослідження біологічного матеріалу від ВРХ у ПЛР

№ з/п	Дослідж. матеріал	*ДНК <i>Chlamydiaceae spp.</i>	*ДНК <i>Leptospira spp.</i>	*ДНК <i>Brucella spp.</i>
1	Біологічний матеріал від ВРХ (паренхіматозні органи)	Не виявлено	Не виявлено	Не виявлено

Таблиця 3. Результати молекулярно-генетичного дослідження біологічного матеріалу від ВРХ у ПЛР

№ з/п	Дослідж. матеріал	*ДНК <i>Mycoplasma spp</i>
1	Біологічний матеріал від ВРХ - молоко №9832	Не виявлено
2	Біологічний матеріал від ВРХ молоко №3674	Виявлено
3	Біологічний матеріал від ВРХ молоко №0982	Не виявлено
4	Біологічний матеріал від ВРХ молоко №6120	Не виявлено

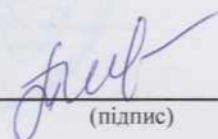
Примітки :

* – випробування поза сферою акредитації.

Відповідальний за складання протоколу

Завідувач лабораторії

(посада)


(підпис)

Т. В. Шаповалова

(ініціали та прізвище)

тел. 068-66-29-616

Протокол випробування № 0491/ПЛР від 09.07.2021

ФСУ-5.10/05 (редакція 03)

Сторінка 2 з 2

**ВИПРОБУВАЛЬНА ЛАБОРАТОРІЯ
ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «СМАРТБІОЛАБ»
LIMITED LIABILITY COMPANY "SMARTBIOLAB"**

Р/р UA063005280000026007455029880 в ПАТ «ОТП Банк» м. Київ, Код ЄДРПОУ 40983204

Адреса юридична: 61072, Україна, м. Харків, пр. Науки, 27 Б

акредитована відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019

Атестат про акредитацію за № 201912

**ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАННЯ
(мікробіологічні)**

№ 0491/МБ від 08.07.2021 р.

Замовник ТОВ «Агрофірма Лан», Сумська обл., Сумський р-н, с. Кіндратівка,
вул. Центральна, буд. №4

(назва/прізвище/адреса)

Рахунок № 447

Дата отримання зразка 01.07.2021р.

Назва зразка та метод випробування 4 зразки молока, *мікробіологічне
дослідження

Мета випробування Дослідження щодо виділення патогенної та умовно
патогенної мікрофлори

Відбір зразків зразки надано замовником

Випробування проводилися 61001, м. Харків, вул. Нетіченська, 25А, буд. И-2
(адреса)

Дата проведення випробувань 01.07.2021 - 08.07.2021

Стан зразків придатні для мікробіологічного дослідження

Примітка:

1. Даний протокол випробування стосується тільки зразків підданих випробуванню.
 2. Повне або часткове передрукування протоколу випробування на паперових або електронних носіях без дозволу ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» забороняється.
 3. Усі права ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» захищені згідно чинного законодавства.
 4. Дані щодо невизначеності надаються за вимогою замовника
- * – випробування поза сферою акредитації.

Особа, що затвердила протокол випробування

Директор ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб»,

К. ВЕТ. Н., С. Н. С.

(посада)



В. В. Кучерявенко

(ініціали та прізвище)

Протокол випробування № 491/МБ **від** 08.07.2021 р.

ФСУ-5.10/04 (редакція 03)

Сторінка 1 з 2

Результати випробування

Таблиця 1. *Результати бактеріологічних досліджень зразків молока

Номер зразку	Досліджу- ваний матеріал	Найменування показника	Результат дослідження	Методи досліджень
491/МБ1	3674	<i>Staphylococcus spp.</i>	Виділено	Згідно ДСТУ 7357:2013 «Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання», ГОСТ 30347-97 «Молоко и молочные продукты. Методы определения <i>Staphylococcus aureus</i> »
491/МБ2	9832	<i>Staphylococcus spp.</i>	Виділено	
491/МБ3	6120	<i>E. coli</i>	Виділено	
491/МБ4	0982	Патогенна мікрофлора	Не виділено	

Таблиця 2*Чутливість виділеної з молока мікрофлори до антибактеріальних препаратів

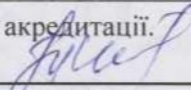
Антибіотики (вказані назви діючих речовин)		Чутливість ізолятів <i>Staphylococcus spp.</i>
Пеніциліни	Ампіцилін	-
	Амоксицилін	-
	Амоксицилін+клавулонова кислота	-
	Клоксацилін	+
аміноглікозиди	Гентаміцин	+
	Стрептоміцин	-
	Канаміцин	+
	Неоміцин	+
	Спектиноміцин	-
макроліди	Тілозин	-
	Азитроміцин	-
	Спіраміцин	-
похідні хінолону	Енрофлоксацин	±
	Норфлоксацин	±
	Гатифлоксацин	±
	Ципрофлоксацин	±
	Левовфлоксацин	±
	Марбофлоксацин	±
Різні групи	Окситетрациклін	+
	Лінкоміцин	-
	Левоміцетин (Хлорамфенікол)	+
	Поліміксин	-
	Ко-Тримаксазол	-
	Триметоприм	-
	Цефтіофур	+
	Цефалексин	+
	Новобіоцин	-

Примітка: «+» - ізолят чутливий до антибіотику, «±» - ізолят помірно чутливий до антибіотику, «-» - ізолят не чутливий до антибіотику

Примітки : * - випробування поза сферою акредитації.

Завідувач лабораторії

(посада)


(підпис)

Т. В. Шаповалова

(ініціали та прізвище)

тел. 068-66-29-616

Протокол випробування № 491/МБ від 08.07.2021 р.

ВИПРОБУВАЛЬНА ЛАБОРАТОРІЯ
ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «СМАРТБІОЛАБ»
LIMITED LIABILITY COMPANY "SMARTBIOLAB"

Р/р UA063005280000026007455029880 в ПАТ «ОТП Банк» м. Київ, Код ЄДРПОУ 40983204

Адреса юридична: 61072, Україна, м. Харків, пр. Науки, 27 Б

акредитована відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019

Атестат про акредитацію за № 201912

ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАННЯ
(мікробіологічні)

№ 491/2/МБ від 13.07.2021 р.

Замовник ТОВ «Агрофірма Лан», Сумська обл., Сумський р-н, с. Кіндратівка,
вул. Центральна, буд. №4

(назва/прізвище/адреса)

Рахунок № 486

Дата отримання зразка 01.07.2021 р.

Назва зразка та метод випробування 3 зразки молока, *мікробіологічне
дослідження

Мета випробування Дослідження щодо виділення патогенної та умовно
патогенної мікрофлори

Відбір зразків зразки надано замовником

Випробування проводилися 61001, м. Харків, вул. Нетіченська, 25А, буд. И-2
(адреса)

Дата проведення випробувань 01.07.2021 - 13.07.2021

Стан зразків придатні для мікробіологічного дослідження

Примітка:

1. Даний протокол випробування стосується тільки зразків підданих випробуванню.
 2. Повне або часткове передрукування протоколу випробування на паперових або електронних носіях без дозволу ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» забороняється.
 3. Усі права ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» захищені згідно чинного законодавства.
 4. Дані щодо невизначеності надаються за вимогою замовника
- * – випробування поза сферою акредитації.

Особа, що затвердила протокол випробування

Директор ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб»,

к. вет. н., с. н. с.

(посада)



В. В. Кучерявенко

(ініціали та прізвище)

Протокол випробування № 491/2/МБ від 13.07.2021 р.

Результати випробування

Таблиця 1. *Результати бактеріологічних досліджень зразків молока

Номер зразку	Досліджу- ваний матеріал	Найменування показника	Результат дослідження	Методи досліджень
Контрольна група				
491/2/МБ1	3670	Патогенна мікрофлора	Не виділено	Згідно ДСТУ 7357:2013 «Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання», ГОСТ 30347-97 «Молоко и молочные продукты. Методы определения <i>Staphylococcus aureus</i> »
491/2/МБ2	2570	Патогенна мікрофлора	Не виділено	
491/3/МБ3	5883	Патогенна мікрофлора	Не виділено	

Таблиця 2. *Результати дослідження молока на загальне бактеріальне забруднення

Номер зразку	Досліджуван- ий матеріал	Найменування показника	Результат дослідження	Методи досліджень
491/2/МБ1	3670	*кМАФАнМ	$58 \times 10^3 \text{ КУО/см}^3$	Згідно ДСТУ 7357:2013 «Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання»
491/2/МБ2	2570	*кМАФАнМ	$64 \times 10^3 \text{ КУО/см}^3$	
491/2/МБ3	5883	*кМАФАнМ	$71 \times 10^3 \text{ КУО/см}^3$	

Таблиця 3. Гігієнічні критерії молока-сировини згідно з ДСТУ 3662:2018 Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови.

Назва показника, одиниця вимірювання	Норма для гатунків			Методи контролювання
	екстра	вищий	перший	
Кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (кМАФАнМ), тис. КУО/см ³	≤100	≤300	≤500	Згідно з ДСТУ 7357, ДСТУ 7089, ДСТУ ISO 4833, ДСТУ IDF 100B
Кількість соматичних клітин, тис/см ³	≤400	≤400	≤500	Згідно з ДСТУ ISO13366-1, ДСТУ ISO13366-2, ДСТУ 7672

Примітки : * – випробування поза сферою акредитації.

Завідувач лабораторії

(посада)

(підпис)

Т. В. Шаповалова

(ініціали та прізвище)

тел. 068-66-29-616

Протокол випробування № 491/2/МБ від 13.07.2021 р.

**ВИПРОБУВАЛЬНА ЛАБОРАТОРІЯ
ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «СМАРТБІОЛАБ»
LIMITED LIABILITY COMPANY "SMARTBIOLAB"**

Р/р UA063005280000026007455029880 в ПАТ «ОТП Банк» м. Київ, Код ЄДРПОУ 40983204

Адреса юридична: 61072, Україна, м. Харків, пр. Науки, 27 Б

акредитована відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019

Атестат про акредитацію за № 201912

**ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАННЯ
(мікробіологічні)**

№ 637/МБ від 10.08.2021 р.

Замовник ТОВ «Агрофірма Лан», Сумська обл., Сумський р-н, с. Кіндратівка,
вул. Центральна, буд. №4

(назва/прізвище/адреса)

Рахунок 534

Дата отримання зразка 02.08.2021р.

Назва зразка та метод випробування 7 зразків молока, 1 зразок фекалій ВРХ
*мікробіологічне дослідження.

Мета випробування Дослідження щодо виділення патогенної та умовно патогенної мікрофлори.

Відбір зразків зразки надано замовником

Випробування проводилися 61001, м. Харків, вул. Нетіченська, 25А, буд. И-2
(адреса)

Дата проведення випробувань від 02.08.2021 р. по 10.08.2021 р.

Стан зразків придатний для мікробіологічного дослідження

Примітка:

1. Даний протокол випробування стосується тільки зразків підданих випробуванню.
 2. Повне або часткове передрукування протоколу випробування на паперових або електронних носіях без дозволу ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» забороняється.
 3. Усі права ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб» захищені згідно чинного законодавства.
 4. Дані щодо невизначеності надаються за вимогою замовника
- * – випробування поза сферою акредитації.

Особа, що затвердила протокол випробування

Директор ВЛ ТОВ «СмартБіоЛаб»,
К. ВЕТ. Н., С. Н. С.
(посада)



В. В. Кучерявенко
(ініціали та прізвище)

Протокол випробування № 637/МБ від 10.08.2021 р.

Результати випробування

Таблиця 1. *Результати дослідження молока на загальне бактеріальне забруднення

№ з/п	№ зразків	Найменування показника	Результат дослідження	Методи досліджень
Контрольна група				Згідно ДСТУ 7357:2013 «Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання», ГОСТ 30347-97 «Молоко и молочные продукты. Методы определения Staphylococcus aureus»
637/МБ1	3670	Staphylococcus aureus	Виділено	
637/МБ2	2570	Staphylococcus spp., E. coli	Виділено	
637/МБ3	5883	Staphylococcus spp.	Виділено	
Дослідна група				
637/МБ4	9832	Патогенна мікрофлора	Не виділено	
637/МБ5	3674	Staphylococcus spp.	Виділено	
637/МБ6	0982	Staphylococcus spp., E. coli	Виділено	
637/МБ7	6120	E. coli	Виділено	

Таблиця 2. *Результати бактеріологічних досліджень зразку патологічного матеріалу

Номер зразка	Досліджуван ий матеріал	Найменування показника	Результат дослідження	Методи досліджень
637/МБ8	Зразок фекалій	<i>E. coli</i> , що володіє β -гемолітичними властивостями	Виділено	Згідно «Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции», «Методических указаний по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях»

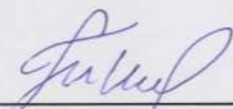
Таблиця 3 *Чутливість виділеної мікрофлори до антибактеріальних препаратів

Антибіотики (вказані назви діючих речовин)		Чутливість ізолятів		
		з молока		з фекалій
		<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
Пеніциліни	Ампіцилін	+	-	-
	Пеніцилін	-	-	-
	Амоксицилін	-	-	-
	Амоксицилін+клавулонова кислота	+	-	-
	Клоксацилін	+	-	-
аміноглікозиди	Гентаміцин	+	-	-
	Стрептоміцин	-	-	-
	Канаміцин	-	-	-
	Неоміцин	-	-	+
	Спектиноміцин	-	+	-
макроліди	Тілозин	-	-	-
	Азитроміцин	-	-	-
	Спіраміцин	-	-	-
Тетрацикліни	Доксицикліна гідрохлорид	-	-	-
	Окситетрациклін	-	-	-
похідні хінолону	Енрофлоксацин	-	-	-
	Офлоксацин	-	+	-
	Норфлоксацин	-	-	±
	Гатифлоксацин	-	-	±
	Ципрофлоксацин	-	-	-
	Левовфлоксацин	-	+	±
	Марбофлоксацин	-	+	-
Різні групи	Лінкоміцин	-	-	-
	Левоміцетин (Хлорамфенікол)	-	-	-
	Поліміксин	-	+	-
	Ко-Тримаксазол	-	-	-
	Триметоприм	-	-	-
	Колістін	н/д	-	±
	Цефалексин	+	-	-
	Цефтіюфур	+	+	+
	Новобіоцин	-	-	-

Примітка: «+» - ізолят чутливий до антибіотику,
«±» - ізолят помірно чутливий до антибіотику,
«-» - ізолят не чутливий до антибіотику,
«н/д» - не досліджується

Примітки :

* – випробування поза сферою акредитації.

Завідувач лабораторії
(посада)

(підпис)

Т. В. Шаповалова

(ініціали та прізвище)

тел. 068-66-29-616

Протокол випробування № 637/МБ від 10.08.2021 р.

ФСУ-5.10/04 (редакція 03)

Сторінка 3 з 3

Вих. №22

Від 01/09/2022 року

ДОВІДКА

Видана аспіранту Сумського НАУ Титуху Ярославу Вікторовичу про те, що в результаті додаткових доклінічних та клінічних досліджень *Bacillus megaterium* NCH 55, проведених ним в умовах промислового тваринництва, отримані нові дані щодо властивостей вказаного пробіотичного штаму. Надані ним пропозиції було розглянуто та схвалено на засіданні правління ПП «Кронос Агро» та прийняте рішення ввести доповнення до існуючої листівки вкладки, в частині застосування *Bacillus megaterium* NCH 55 для лікування маститу, гіпо- та агалакції у великої рогатої худоби.

Директор ПП «Кронос Агро»



І.О. Мартинюк



Додаток В
Методичні вказівки

Методичні вказівки

**«РОЗРОБКА АЛЬТЕРНАТИВНИХ МЕТОДІВ ЛІКУВАННЯ ДІЙНИХ
КОРІВ ЗА СУБКЛІНІЧНОГО МАСТИТУ»**

для проведення лабораторно-практичних занять та самостійної роботи
студентів 3-4 курсу студентів денної форми навчання з дисципліни
«Ветеринарне акушерство» денної форми навчання, студентів скороченого
терміну, магістрів спеціальності 211 «Ветеринарна медицина»

Суми 2022

Укладачі:

Титух Я.В. аспірант кафедри акушерства та хірургії,
Шкромана О.І. д.вет.н., професор, завідувач кафедри акушерства та
хірургії,
Мусієнко Ю.В. к.в.н., доцент кафедри акушерства та хірургії

Розробка альтернативних методів лікування дійних корів за субклінічного
мастити. Методичні вказівки для проведення лабораторно-практичних занять
та самостійної роботи студентів з дисципліни «Ветеринарне акушерство»
денної форми навчання спеціальності 211 «Ветеринарна медицина». – Суми,
2022. – 30 с.

Дані методичні вказівки містять інформацію про альтернативні методи
лікування маститу корів, що застосовуються в тваринництві, вказуються та
порівнюються способи різних засобів лікування. Рекомендовані як
додатковий матеріал при виконанні лабораторно-практичних занять та
самостійної роботи студентів спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».

Рецензенти:

Р.В. Петроп, професор, завідувач кафедри вірусології, патанатомії та хвороб
іптих Сумського НАУ,
О.І. Коваленко, к. вет. н., директор Сумської регіональної державної
лабораторії Держпродспожислужби.

Відповідальний за випуск Титух Я.В., аспірант кафедри акушерства та
хірургії

Розглянуто та рекомендовано до видання:
навчально-методичною радою факультету ветеринарної медицини СНАУ,
протокол № 9 від «18» квітня 2022 року.
Вченою радою СНАУ, протокол №12 від «25» квітня 2022 року.

Додаток Г

Висновок засідання комісії з біоетики

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової та міжнародної діяльності

Сумського національного аграрного університету,

професор



Ю. І. ДАНЬКО

Ю. І. Данько 2022 р.

ВИСНОВОК ЗАСІДАННЯ КОМІСІЇ З БІОЕТИКИ

від «5» жовтня 2022р протокол № 1

Комісія з біоетики Сумського національного аграрного університету, затверджена рішенням вченої ради СНАУ протокол № 5 від «3» жовтня 2022 р. в складі:

Голова комісії: Шкромада Оксана Іванівна, д.вет.н., професор, завідувач кафедри акушерства та хірургії;

Заступник голови комісії: Хмельничий Леонтій Михайлович, д. с.-г. н., професор, завідувач кафедри генетики, селекції та біотехнології тварин;

Секретар: Чекан Олександр Миколайович, к.в.н., доцент кафедри акушерства та хірургії

Члени комісії:

Касяненко Оксана Іванівна, д. вет. н., професор, завідувач кафедри епізоотології та паразитології;

Петров Роман Вікторович, д.вет.н., професор, завідувач кафедри вірусології, патанатомії та хвороб птиці;

Улько Лариса Григорівна, д. вет. н., професор, завідувач кафедри фармакології, терапії та клінічної діагностики.

Фотіна Ганна Анатоліївна, д. вет. н., професор, професор кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогігієни та безпеки і якості продуктів тваринництва;

Вивчила матеріали експериментальних досліджень, аспіранта кафедри акушерства та хірургії Титуха Ярослава Вікторовича на тему: «Клініко-експериментальне обґрунтування лікування корів за субклінічного маститу»,

проведені на коровах 1-5 лактації. Експерименти проводились протягом 2018-2022 р.р. на дійних коровах породи голштин: здорових та хворих на мастит з використанням пробіотичних штамів мікроорганізмів *Bacillus megaterium* NCH 55. Тварини піддавались діагностичним дослідженням, утримувалися в належних умовах та отримували корм згідно раціону.

Кількість тварин у групах була мінімальною для проведення дослідів. При утриманні дослідних тварин дотримувалися основних принципів біоетики, а саме не допускали спраги, недоїдання, голоду, дискомфорту при утриманні та стресу при проведенні досліджень. Тварини не піддавались вимушеній евтаназії.

Висновок: Експериментальні дослідження, що викладені в дисертаційній роботі Титуха Ярослава Вікторовича на тему: «Клініко-експериментальне обґрунтування лікування корів за субклінічного маститу», ґрунтувалися на принципах моральних цінностей людини, не нанесення шкоди тваринам, милосердя та справедливості до них. При проведенні експериментальних досліджень Титух Я.В. за темою дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – «Ветеринарна медицина», були дотримані всі біоетичні вимоги, згідно Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 440-IX від 14.01.2020.

Підписи:

Голова комісії



О.І. Шкромада

Секретар комісії:



О.М. Чекан