



UDC 618.19-002:636.02:615.281.9

Toxicological evaluation of the drug "Fagomast" for the treatment of mastitis in cows

Yu. V. Horiuk¹, M. D. Kukhtyn², V. L. Kovalenko³, V. P. Mizyk¹

¹State Agrarian and Engineering University in Podilya, Kamianets-Podilskyi, Ukraine

²Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ukraine

³State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 14.04.2021
Received in revised form
05.05.2021
Accepted
25.05.2021

¹State Agrarian and
Engineering University in
Podilya, 13, Schevchenko
str., Kamianets-Podilskyi,
Khmelnyskyi region, 32300,
Ukraine

E-mail: goruky@ukr.net

²Ternopil Ivan Puluj National
Technical University, Ruska
str., 56, Ternopil, 46000,
Ukraine

E-mail:

kuchtynnic@gmail.com

³State Scientific Control
Institute of Biotechnology
and Strains of
Microorganisms, Donetsk
str., 30, 03151, Kyiv, Ukraine
E-mail:

kovalenkodoktor@gmail.com

Horiuk, Yu. V., Kukhtyn, M. D., Kovalenko, V. L., & Mizyk, V. P. (2021). Toxicological evaluation of the drug "Fagomast" for the treatment of mastitis in cows. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 7, 29-34, DOI: 10.31890/vttp.2021.07.04.

Modern technologies for the manufacture of phage preparations provide a high degree of purification from the products of bacterial activity, endotoxins and exotoxins, products of phagolysis of bacterial cells. However, bacteriophage preparations should be tested for safety and the absence of bacterial or other toxic contaminants. Confirmation of the safety of bacteriophage drugs is the study of their toxicity administered into the stomach once or over a period of time.

The aim of the study was to determine the acute and chronic toxicity of the drug based on bacteriophages "Fagomast" for the treatment of mastitis in cows.

Experimental studies to determine the toxicity of the drug "Fagomast" were performed on white mice by oral administration according to current methods. Clinical trials have been conducted in accordance with the ethical principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes. The results were calculated by the Kerber method. The experiment to determine acute toxicity lasted for 14 days. During the experiment, the behavior of animals was observed, and the number of deaths in each group was recorded.

In vivo toxicity assessment, namely the determination of acute toxicity with a single administration and repeated use of the drug aims to determine the potential development of bacteriophage-induced toxic effects on living organisms. Studies have shown that the acute toxicity of the drug "Fagomast" corresponds to the LD₅₀ - 5000 mg / kg live weight of animals. The drug does not have cumulative properties. The concentration of the drug does not cause irritation. It has no sensitizing properties and is non-toxic when ingested orally. Blood morphological parameters did not change significantly. According to the established signs, the working solutions of the drug "Fagomast" are classified as class IV (low-toxic) safety.

Key words: drug "Fagomast", acute toxicity, laboratory animals.

Токсикологическая оценка препарата «Фагомаст» для лечения маститов коров

Ю. В. Горюк¹, М. Д. Кухтин², В. Л. Коваленко³, В. П. Мизык¹

¹ Подольский государственный аграрно-технический университет, г. Каменец-Подольский, Украина

² Тернопольский национальный технический университет имени Ивана Пулюя, Украина

³ Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, Киев, Украина

Современные технологии изготовления фаговых препаратов предусматривают высокую степень очистки от продуктов жизнедеятельности бактерий, эндо и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток. Однако, препараты бактериофагов необходимо исследовать на соответствие требованиям безопасности и отсутствие бактериальных или других токсичных загрязнений. Подтверждение безопасности препаратов бактериофагов является изучение их токсичности при введении в желудок однократно или в течение определенного периода. Целью работы было определить острую и хроническую токсичность препарата на основе бактериофагов «Фагомаст» для лечения мастита коров. Экспериментальные исследования по определению токсичности препарата «Фагомаст» проводили на белых

мышам, путем перорального введения согласно действующих методик. Клинические исследования проводились согласно этическим принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей. Расчет результатов проводили по методу Кербера. Опыт по определению острой токсичности длился 14 суток. В течение опыта наблюдали за поведением животных, фиксировали количество погибших в каждой группе. Оценка токсичности *in vivo*, а именно определения острой токсичности при однократном введении и многократное применение препарата имеет целью определить потенциальное развитие индуцированных бактериофагами токсических эффектов на живых организмах. По результатам исследований установлено, что острая токсичность препарата «Фагомаст» соответствует LD₅₀ - 5000 мг / кг живой массы животных. Препарат не обладает кумулятивными свойствами. Препарат не вызывает раздражения, не обладает сенсibiliзирующими свойствами. Препарат при пероральном попадании в живой организм. При исследовании крови морфологические показатели достоверно не изменялись. По установленным признакам рабочие растворы препарата «Фагомаст» относятся к IV классу (малотоксичные) безопасности.

Ключевые слова: препарат «Фагомаст», острая токсичность, лабораторные животные.

Токсикологічна оцінка препарату «Фагомаст» для лікування корів за маститу

Ю. В. Горюк¹, М. Д. Кухтин², В. Л. Коваленко³, В. П. Мізик¹

¹ Подільський державний аграрно-технічний університет, м. Кам'янець-Подільський, Україна

² Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Україна

³ Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ, Україна

В статті наведено результати токсикологічної оцінки препарату «Фагомаст» для лікування маститу корів. За результатами досліджень встановлено, що гостра токсичність препарату на основі бактеріофагів «Фагомаст», становить більше ніж LD₅₀ – 5000 мг/кг живої маси тварин. Препарат «Фагомаст» не має кумулятивних властивостей. Препарату не викликає подразнення, не володіє сенсibiliзуючими властивостями та нетоксичний при пероральному введенні в живий організм. При дослідженні крові морфологічні показники достовірно не змінювались. За встановленими ознаками препарат «Фагомаст» віднесено до 4 класу (малотоксичні) щодо безпечності.

Ключові слова: препарат «Фагомаст», гостра токсичність, лабораторні тварини.

Вступ

Актуальність теми. Нині існує чимало засобів та методів для лікування маститу корів на основі антибіотиків, рослинних компонентів, наночастинок металів тощо (Horiuk, 2018; Horiuk et al., 2019; Kortright, Chan, Koff, & Turner, 2019). Однак, існуючі методи не завжди ефективні та потребують пошуку нових альтернатив (Yengkho, Gupta, Loksha, Handique, & Singh, 2019). Одним із нових методів лікування є фаготерапія, тобто використання бактеріальних вірусів для знищення бактеріальних інфекцій (Gill et al., 2006; Horiuk, Horiuk, Kukhtyn, Tsvihun, & Kernychnyi, 2020).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Бактеріофаги складаються здебільшого з нуклеїнових кислот і білків, тому вони за своєю суттю нетоксичні (Manohar, Tamhankar, Leptihn, & Ramesh, 2019; Li, Lin, Jing, & Wang, 2020). Існує ряд досліджень, які вказують на безпечність бактеріофагів для людей і тварин. Численні результати досліджень підтвердили наявність фагів у мікробіомах дихальних шляхів, піхви, шкіри, ротової порожнини та кишечника ссавців (Morrisette, Kebriaei, Lev, Morales, Rybak, 2020; Raza, 2021). Такий стійкий непатогенний зв'язок фагів з вищими організмами пояснюється тим що реплікація вірусу відбувається лише у бактеріальних господарів, не вражаючи інші тканини. Фаги також не можуть заражати еукаріотичні клітини, оскільки структура їх рецепторів клітинної поверхні значно відрізняється від бактеріальних господарів бактеріофагів. Однак фаги здатні вільно поширюватися по тілу тварини: їх виявляли в крові, лімфі та внутрішніх органах. Слід також зазначити, що бактеріофаги постійно споживаються з їжею, оскільки велика їх кількість є компонентами нормальної мікрофлори сирих та ферментованих харчових продуктів (Carlton, Noordman, Biswas, De Meester, & Loessner, 2005; Kang, Kim, Jung, & Woo, 2013; Chen, Sun, Yang, Song, & Wu, 2018).

Доклінічні випробування з визначення токсичності бактеріофагів при пероральному застосуванні проведени науковцями (Kang, Kim, Jung, & Woo, 2013) показали, що введення бактеріофагу wks13 літичного щодо *Salmonella* в кількості 10¹¹ БУО/кг маси тіла не викликало жодних токсикологічних ефектів. Такі ж результати отримані (Carlton, Noordman, Biswas, De Meester, & Loessner, 2005) при дослідженні токсичності бактеріофагу P100 для контролю *Listeria monocytogenes*. Відсутність доказів токсичності бактеріофагів також спостерігалось в дослідженнях (Chen, Sun, Yang, Song, & Wu, 2018), при яких мишам інтраперитонеально вводили фаг РНВ02 у дозі 1 × 10⁸ PFU/тварину, при цьому не виявили жодних змін.

Сучасні технології виготовлення фагових препаратів передбачають високий ступінь очищення від продуктів життєдіяльності бактерій, ендотоксинів, продуктів фаголізу бактеріальних клітин. Однак, препарати бактеріофагів необхідно досліджувати на відповідність вимог безпеки і відсутність бактеріальних чи інших токсичних забруднень. Підтвердження безпеки препаратів бактеріофагів є вивчення їх токсичності при введенні в шлунок одноразово чи протягом певного періоду (Ponomarenko, Kovalenko, Ponomarenko, & Balackiy, 2017; Kovalenko et al., 2019).

Метою роботи було визначити гостру та хронічну токсичність препарату на основі бактеріофагів «Фагомаст» для лікування маститу корів.

Препарат для лікування маститу корів «Фагомаст» на основі бактеріофагу *Phage SAvB14*, який високолітичний щодо *S. aureus var. bovis*, основного збудника даного захворювання. 1 мл препарату містить специфічні бактеріофаги у концентрації не менш 1×10^8 фагових часток. Препарат призначено для внутрицестирнального введення.

Визначення токсичності препарату проводилось у лабораторії Тернопільської дослідної станції Інституту ветеринарної медицини НААН. Дослідження проводили згідно з чинними методиками (GOST, 1982; OECD, 2001; Kotsiumbas, Maluk, & Patereha, 2006). Клінічні дослідження проводились згідно з етичними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 р).

Експериментальні дослідження проводили на білих мишах. Для досліду було взято тварини з середньою масою тіла 25 - 30 г, віком 18 – 20 тижнів. Тварин утримували в приміщеннях з відповідними параметрами мікроклімату і розміщували в пластикових клітках з дротяними кришками. Тваринам давали їжу та воду *ad libitum*. Вони пройшли 8-денний карантин та 14-денну акліматизацію.

Обрахунок результатів проводили за методом Кербера. Дослід з визначення гострої токсичності тривав 14 діб. Протягом досліду спостерігали за поведінкою тварин, фіксували кількість загиблих у кожній групі. Для досліду з визначення гострої токсичності препарату було сформовано 3 групи (дві дослідних та одна контрольна) по 3 тварини у кожній. Мишей дослідних груп перед введенням препарату витримували на голодній дієті близько 12 годин. Доза препарату для 1-ї дослідної групи складала 2 000 мг/кг, для другої 5 000 мг/кг. Вміст фагових частин в 1 мл препарату складав 1×10^8 БУО. Тваринам контрольної групи задавали дистильовану воду. Загальні клінічні спостереження проводились щодня. Оцінювали клінічні особливості, включаючи зміни серцево-судинної, дихальної, травної, сечовидільної систем. Спостереження за всіма тваринами на предмет захворюваності та смертності, проводили три-чотири рази на добу протягом 14-денного досліду. Вага тіла тварин визначали безпосередньо перед початком досліджень, а також на 7 і 14 день. Після 14 днів застосування препарату 6 мишей (по 2 з кожної групи) піддали автаназії та провели патрозтин. Результати розтину всіх досліджуваних мишей порівнювали з результатами розтинів тварин контрольної групи. За іншими тваринами спостерігали протягом наступних 3-х тижнів.

Результати

Результати дослідження гострої токсичності препарату «Фагомаст», який вводили білим мишам в шлунок в дозах 2 000 та 5 000 мг/кг, не виявили ніяких ознак токсичності (табл. 1).

Таблиця 1

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

| Групи тварин | Клінічні ознаки та патзміни | | | | | | Смертність |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------------|------------|
| | Загальний стан | Серцево-судинна система | Дихальна система | Травна система | Нервова система | Сечовидільна система | |
| 1-ша дослідна, n=3 | Н | Н | Н | Н | Н | Н | 0 |
| 2-га дослідна, n=3 | Н | Н | Н | Н | Н | Н | 0 |
| Контрольна, n=3 | Н | Н | Н | Н | Н | Н | 0 |

Примітка: Н – не виявлено змін.

При вивченні властивостей препарату «Фагомаст» стосовно кумулятивної дії, то за результатами спостережень за дослідними і контрольними тваринами упродовж усього терміну експерименту не було виявлено жодних відхилень в поведінці, фізіологічні функції залишалися в нормі. Загибелі тварин не було. При патологоанатомічних дослідженнях, що проведені при розтині забитих мишей видимих макроскопічних змін у внутрішніх органах не виявлено. Отже, препарат «Фагомаст» не володіє вираженою кумулятивною дією.

При вивченні подразнюючої дії препарату «Фагомаст» на шкіру дослідних тварин не виявлено будь-яких видимих змін на епідермісі. Крім того, розчини препарату «Фагомаст» не впливали на зміну поведінки тварин дослідної групи.

При вивченні сенсibiliзуючої дії препарату «Фагомаст» з'ясовано, що в перші хвилини після аплікації препаратом тварини робили спробу його злизати, далі їх поведінка не відрізнялась від звичайної. На поверхні шкіри протягом 2-х годин не спостерігали змін. При дослідженні ділянок шкіри із аплікацією розчинами препарату «Фагомаст», будь-яких патологічних ознак не виявлено. За результатами досліджень було встановлено, що препарат «Фагомаст» не викликає подразнюючої і сенсibiliзуючої дії.

При вивченні шкірно-резорбтивних властивостей препарату «Фагомаст» при його застосуванні ознак токсичності не виявлено, що засвідчували результати досліджень – всі миші залишалися живими зі збереженням апетиту і адекватності поведінки.

З даних наведених в табл. 1 видно, що навіть максимальна доза препарату не викликала змін загального стану, роботи серцево-судинної, дихальної, травної, нервової та сечовидільної систем. Середня вага дослідних груп мишей, які отримували фаг та контрольної групи суттєво не відрізнялася. За період дослідження тварини добре поїдали корм, не відмічалось ніяких фізіологічних відхилень. При патологічному розтині явних відмінностей між дослідними та контрольною групами не виявлено. Розміщення внутрішніх органів правильне, просвіт трахеї та бронхів вільний, тканина легень блідо-рожевого кольору, капсула нирок легко знімалася,

мозкова і кіркова речовина добре помітні на розрізі. Результати розтину тканин шлунка мишей, яким задавали «Фагомаст», не виявили жодних запальних процесів ні на зовнішній, ні на внутрішній поверхні.

Результати токсичності препарату «Фагомаст» при багаторазовому введенні наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Смертність, клінічні ознаки та патзміни при дослідженні токсичності препарату «Фагомаст» при багаторазовому введенні

| Групи тварин | Клінічні ознаки та патзміни | | | | | | Смертність |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------------|------------|
| | Загальний стан | Серцево-судинна система | Дихальна система | Травна система | Нервова система | Сечовидільна система | |
| 1-ша дослідна, n=4 | Н | Н | Н | Н | Н | Н | 0 |
| 2-га дослідна, n=4 | Н | Н | Н | Н | Н | Н | 0 |
| Контрольна, n=4 | Н | Н | Н | Н | Н | Н | 0 |

Примітка: Н – не виявлено змін.

Дані наведені в табл. 2 вказують на те, що введення препарату «Фагомаст» протягом 14 днів змін з боку серцево-судинної, дихальної, травної, сечовидільної систем не викликало. Результати клінічного спостереження було підтверджено результатами патрозтину.

Нами проведено вивчення морфологічних показників периферичної крові мишей після обробки препаратом «Фагомаст», результати представлені в табл. 3.

Препарат «Фагомаст» не впливав на стан еритропоезу так, як після обробки тварини у білих мишей дослідної групи вміст гемоглобіну невірогідно збільшився на 5.9 % проти початкових даних при тому, що загальна кількість еритроцитів периферичної крові мишей була в межах фізіологічної норми до та після завершення експерименту.

Таблиця 3

Гематологічні показники периферичної крові мишей за обробки препаратом «Фагомаст», %, $M \pm m$, n=9

| Показники | Контрольні тварини | Дослідні тварини | | | |
|--------------------|--------------------|------------------|------------------------------|-----------|-----------|
| | | Початкові дані | За обробки препаратом через: | | |
| | | | 3 год | 7 діб | 14 діб |
| Еритроцити, Т/л | 9,5±0,1 | 8,6±0,3 | 8,3±0,6 | 9,1±0,4 | 9,3±0,5 |
| Лейкоцити, Г/л | 9,4±0,1 | 9,5±0,2 | 10,1±0,3 | 9,9±0,1 | 9,4±0,2 |
| Гемоглобін, г/л | 95,1±1,3 | 97,1±3,1 | 103,1±2,1 | 105,1±1,2 | 102,1±1,2 |
| Лейкограма: | | | | | |
| базофіли | 1,0±0,1 | – | 1,0±0,4 | 1,0±0,1 | – |
| еозинофіли | 3,0±0,1 | 4,0±0,1 | 5,1±0,2 | 4,0±0,1 | 3,0±0,2 |
| нейтрофіли: | | | | | |
| міелоцити | – | – | – | – | – |
| юні | – | – | – | – | – |
| паличкоядерні | 4,1±0,1 | 4,2±0,2 | 2,1±0,3 | 2,0±0,3 | 3,5±0,2 |
| сегментоядерні | 21,0±0,2 | 19,8±0,3 | 20,1±0,1 | 21,3±1,1 | 20,5±1,1 |
| лімфоцити | 72,0±1,5 | 69,0±1,7 | 80,0±1,3 | 66,0±1,1 | 67,0±1,8 |
| моноцити | 3,0±0,1 | 3,0±0,2 | 4,0±0,4 | 4,0±0,3 | 3,5±0,2 |

Примітка: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – проти початкових даних.

Обробка лабораторних тварин препаратом «Фагомаст», як показали дослідження, не чинила будь-якого впливу на лейкопоез, про що свідчать показники загальної кількості лейкоцитів в периферичній крові дослідних тварин на початку та впродовж усього експерименту.

Проведена диференціація лейкоцитів периферичної крові дослідних тварин, виражена у лейкограмі, показала, що тимчасові зміни морфологічного складу були відмічені через 3 год після обробки препаратом. Зокрема, в цей період спостерігалася еозинофілія, яка характеризувалася вірогідним зростанням кількості еозинофілів ($p < 0,01$) щодо початкових даних. Проте, уже через 7 діб після обробки, кількість еозинофілів в периферичній крові дослідної групи мишей була оптимізована до норми та залишалася такою до кінця терміну досліджень.

Крім того, через 3 год після обробки білих мишей препаратом «Фагомаст» був також встановлений і лімфоцитоз так, як відносний вміст лімфоцитів вірогідно ($p < 0,05$) зростав на 18 % проти власних початкових даних. Слід відмітити, що лімфоцитоз був відносним з огляду на те, що загальна кількість лейкоцитів знаходилася в межах фізіологічної норми та через 7 діб після обробки відносний вміст лімфоцитів був оптимізований і залишався в межах норми до кінця терміну експерименту.

Всі інші морфологічні показники периферичної крові у дослідних мишей знаходилися в межах фізіологічної норми упродовж усього терміну експерименту.

Таким чином, обробка тварин препаратом «Фагомаст» не впливає на загальний гемопоез та викликає незначну тимчасову еозинофілію та лімфоцитоз, які оптимізувалися до норми за 7 діб після застосування препарату.

Обговорення

Однією з вимог до антибактеріального препарату, що виводиться на ринок, є підтвердження його безпеки (Chan & Abedon, 2012; Kovalenko, Kovalenko, Ponomarenko, Kukhtyn, & Garkavenko, 2018). Незважаючи на те, що бактеріофаги успішно використовуються в світовій лікувальній практиці, в Україні недостатньо чинних нормативних документів для оцінки токсичності препаратів бактеріофагів. У цьому дослідженні ми визначили гостру та хронічну токсичність препарату на основі бактеріофагів «Фагомаст» для лікування маститу корів. При постановці дослідів керувалися вимогами ГОСТ 12.1.007-76 «Шкідливі речовини. Класифікація та загальні вимоги нешкідливості», принципами OECD «Керівні принципи щодо гострої токсичності хімічних речовин» та стандартами GLP (Належна лабораторна практика).

Оцінка токсичності *in vivo*, а саме визначення гострої токсичності при одноразовому введенні та багаторазове застосування препарату мала на меті визначити потенційний розвиток індукованих бактеріофагами токсичних ефектів на живих організмах. При дослідженні токсичності ми білим мишам вводили максимально рекомендовані дози стандартом OECD препарату одноразово та протягом 14 днів. За результатами досліджень жодних змін при клінічному обстеженні тварин та змін при патологічному розтині не виявлено. Отриманні нами дані узгоджуються з наявними дослідженнями токсичності, проведеними з іншими бактеріофагами. Так, тестування бактеріофагу P100 щурам Wistar не викликало ніяких аномальних фізичних або поведінкових ознак (Carlton, Noordman, Biswas, De Meester, & Loessner, 2005). Введення бактеріофага проти *сальмонели* wksl3 мишам BALB також не спричинювало жодних гострих побічних ефектів, пов'язаних з присутністю бактеріофагів в організмі (Kang, Kim, Jung, & Woo, 2013). Інші дослідницькі групи, які проводили більш довготривалі дослідження токсичності на мишах із використанням фагових коктейлів проти різних типів бактерій, також підтвердили загальне припущення, що введення фагів не має побічних ефектів на здоров'я тварин, їх життєві параметри та поведінку (Chen, Sun, Yang, Song, & Wu, 2018).

В результаті проведених досліджень встановлено, що навіть максимальна доза введення препарату (5 000 мг/кг) одноразово чи протягом 14 днів не викликала загибелі і гострої інтоксикації у піддослідних тварин. Отже, препарат «Фагомаст» можна вважати малотоксичним та відносити до IV класу згідно ГОСТ 12.1.007-76 та до V категорії згідно OECD. Упродовж наступних 3-х тижнів змін клінічного стану лабораторних тварин не спостерігали.

Висновки

1. За результатами досліджень з'ясовано, що гостра токсичність препарату «Фагомаст» відповідає LD₅₀ – 5000 мг/кг живої маси тварин.
2. Препарат не володіє кумулятивними властивостями.
3. Концентрат препарату не викликає подразнення, не володіє сенсibiliзуючими властивостями та нетоксичний при пероральному попаданні в живий організм.
4. При дослідженні крові морфологічні показники достовірно не змінювались. За встановленими ознаками робочі розчини препарату «Фагомаст» віднесено до IV класу (малотоксичні) щодо небезпечності.

References

- Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., De Meester, E. D., & Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3), 301-312. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.08.005>.
- Chan, B. K., & Abedon, S. T. (2012). Phage therapy pharmacology: phage cocktails. *Advances in applied microbiology*, 78, 1-23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394805-2.00001-4>
- Chen, Y., Sun, E., Yang, L., Song, J., & Wu, B. (2018). Therapeutic Application of Bacteriophage PHB02 and Its Putative Depolymerase Against *Pasteurella multocida* Capsular Type A in Mice. *Front. Microbiol.*, 9, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01678>.
- Gill, J. J., Pacan, J. C., Carson, M. E., Leslie, K. E., Griffiths, M. W., & Sabour, P. M. (2006). Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(9), 2912-2918. <https://doi.org/10.1128/AAC.01630-05>
- GOST 12.1.007–76. SSBT. Harmful substances. Classification and general safety requirements. Enter. 01.01.77. Checked on 10/01/81; Changed No. 1; Reissued 12/01/81. M.: Publishing house of standards, 1982. 6 p.
- Horiuk, Y. V. (2018). Fagotherapy of cows mastitis as an alternative to antibiotics in the system of obtaining environmentally safe milk. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 20(88), 42-47. <https://doi.org/10.32718/nvlvet8807>
- Horiuk, Y., Horiuk, V., Kukhtyn, M., Tsvihun, A., & Kernychnyi, S. (2020). Characterization of lytic activity of Phage SAvB14 on *Staphylococcus aureus* variant bovis. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 7(3), 509-513. <http://doi.org/10.5455/javar.2020.g447>.
- Horiuk, Y., Kukhtyn, M., Kovalenko, V., Kornienko, L., Horiuk, V., & Liniichuk, N. (2019). Biofilm formation in bovine mastitis pathogens and the effect on them of antimicrobial drugs. *Indep J Manag Prod*, 10(7), 897–910. <https://doi.org/10.14807/ijmp.v10i7.1012>.
- Kang, H. W., Kim, J. W., Jung, T. S., & Woo, G. J. (2013). wksl3, a New biocontrol agent for *Salmonella enterica* serovars enteritidis and typhimurium in foods: characterization,

- application, sequence analysis, and oral acute toxicity study. *Applied and environmental microbiology*, 79(6), 1956-1968. <https://doi.org/10.1128/AEM.02793-12>
- Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. (2019). Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell host & microbe*, 25(2), 219-232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>
- Kotsiumbas, I. Y., Malyk, O. H., & Patereha, I. P. (2006). Doklinichni doslidzhennia veterynarnykh likarskykh zasobiv. Za red. I. Ia. Kotsiumbasa. *Lviv: Triada plus (in Ukrainian)*.
- Kovalenko, V. L., Lyasota, V. P., Balatskiy, Y. O., Bukalova, N. V., Bogatko, N. M., Bahur, T. I., & Tkachuk, S. A. (2019). Bactericidal properties of the "Geocid" preparation. *Scientific repost of NULES of Ukraine*, 77, 1-12.
- Kovalenko, V.L., Kovalenko, P.L., Ponomarenko, G.V., Kukhtyn, M.D. & Garkavenko, V.M. (2018). Changes in lipid composition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cells under the influence of disinfectants Barez, Biochlor and Geocide. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 547-550. https://doi.org/10.15421/2018_248 .
- Li, M., Lin, H., Jing, Y., & Wang, J. (2020). Broad-host-range *Salmonella* bacteriophage STP4-a and its potential application evaluation in poultry industry. *Poultry science*, 99 (7), 3643-3654. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.051>
- Manohar, P., Tamhankar, A. J., Leptihn, S., & Ramesh, N. (2019). Pharmacological and immunological aspects of phage therapy. *Infectious Microbes & Diseases*, 1(2), 34-42. <https://doi.org/10.1097/IM9.000000000000013>
- Morrisette, T., Kebriaei, R., Lev, K. L., Morales, S., Rybak, M. J. (2020). Bacteriophage therapeutics: a primer for clinicians on phage-antibiotic combinations. *Pharmacotherapy*, 40, 153–68. <https://doi.org/10.1002/phar.2358>
- Organisation for Economic Co-operation and Development. 2001. OECD guidelines for acute toxicity of chemicals, no. 420. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Ponomarenko, G. V., Kovalenko, V. L., Ponomarenko, O. V., & Balackiy, Yu. O. (2017). Effects of microbicide based on lactic acid and metal nanoparticles on laboratory animals. *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(4), 482–485. https://doi.org/10.15421/2017_148
- Raza, A. (2021). Bacteriophage Therapy: Recent Development And Applications. *Sch Bull*, 7(3), 27-37. <https://doi.org/10.36348/sb.2021.v07i03.003>
- Yengkho, R., Gupta, M., Lokesha, E., Handique, B., & Singh, L. K. (2019). Bovine mastitis and its treatment strategies. *Res Rev J Vet Sci Technol*, 7(3), 11–16. <https://doi.org/10.37591/rrjovst.v7i3.1540>.