ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ДІЇ *BACILLUS MEGATERIUM* ЗА СУБКЛІНІЧНОГО МАСТИТУ КОРІВ

Н. П. Гребеник, канд. вет. наук, доцент,
Я. В. Титух, аспірант

Сумський національний аграрний університет
вул. Г. Кондратьєва, 160, м. Суми, 40021, Україна
yaroslavusvet@gmail.com

Діагностика та лікування маститу у молочних господарствах наразі є важливим завданням перед лікарями ветеринарної медицини для недопущення розповсюдження хвороби серед стада та попередженню потрапляння молока від хворих тварин у продукцію для споживання.

Дослідження та лікування субклінічного маститу у дійних корів проводили у ТОВ «Агрофірма Лан», с. Кіндратівка, Сумського району Сумської області. Коровам, хворим на субклінічний мастит, дослідних (Д) груп задавали концентровані корми з додаванням *Bacillus megaterium* ($1 \cdot 10^9$ КУО/г) в дозі 35 г на тварину протягом 30 діб. Контрольній групі корів (К) давали звичайний раціон для дійних корів. Метою роботи було дослідження ефективності застосування пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* ($1 \cdot 10^9$ КУО/г) для лікування субклінічного маститу корів

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).

Після завершення дослідного періоду у хворих на субклінічний мастит корів збільшувався рівень загального білка на 36,67 % та глобулінів – на 75,11 %. 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. Також рівень метаболітів у хворих корів по закінченню періоду лікування був менше АСТ на 53,69 % та АЛТ – на 51,33 %, порівняно до початку дослідження.

Результати підтверджують відсутність токсичного впливу використаного пробіотика для лікування маститу. Також *Bacillus megaterium* ($1 \cdot 10^9$ КУО/г) в дозі 35 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 татунку «Екстра».

Ключові слова: КОРОВИ, СУБКЛІНІЧНИЙ МАСТИТ, *BACILLUS MEGATERIUM*, СОМАТИЧНІ КЛІТИНИ, МЕТАБОЛІТИ, ЗБУДНИКИ МАСТИТУ.

DETERMINATION OF EFFECTIVENESS *BACILLUS MEGATERIUM* FOR SUBCLINICAL COW MASTITIS

N. P. Grebenik, Ya. V. Tytukh

Sumy National Agrarian University
160, Herasym Kondratiev str., Sumy, 40021, Ukraine
yaroslavusvet@gmail.com

Diagnosis and treatment of mastitis in dairy farms is currently an important task for veterinarians to prevent the spread of the disease among the herd and to prevent the milk entrance from sick animals as a component of marketable produce.

Research and treatment of subclinical mastitis in dairy cows was carried out in LLC "Agrofirma Lan", Kindrativka village, Sumy district, Sumy region. Cows of experimental (D) groups with subclinical mastitis were feed concentrate with the addition of *Bacillus megaterium* ($1 \cdot 10^9$ CFU/g) at a dose of 35 grams per animal over a period of 30 days.

The control group of cows (K) was given the routine food for dairy cows. The aim of the study was to investigate the effectiveness of treatment with probiotic strain *Bacillus megaterium* ($1 \cdot 10^9$ CFU/g) in subclinical mastitis.

The presence of possible metabolic changes in the body of cows was determined by biochemical parameters in serum samples ($n = 15$), which were studied spectrophotometrically by conventional methods (SHIMADZU UV-1800, Japan).

At the end of the study period in cows with subclinical mastitis increase in total protein by 36,67 % and globulin by 75,11% was diagnosed. Prior to the start of the study period, cows with subclinical mastitis had increased urea nitrogen levels by 48,87 %, which is higher than the allowable reference values for cows. Also, the level of metabolites in sick cows at the end of the treatment period was lower by AST by 53,69 % and ALT by 51,33 %, compared with the beginning of the study. The results confirm the absence of toxic effects from the probiotic used for treatment. Also, *Bacillus megaterium* ($1 \cdot 10^9$ CFU/g) has a therapeutic effect at a dose of 35 grams per animal and reduces inflammation in the udder. Confirmation of these results is the indicator of the somatic cell count (SCC), which is reduced by 70 times at the end of the experiment compared to the beginning, which classifies the probiotic to the "Extra" grade.

Keywords: COWS, SUBCLINICAL MASTITIS, *BACILLUS MEGATERIUM*, SOMATIC CELLS, METABOLITES, MASTITIS DEGREES.

Мастит великої рогатої худоби – це запалення молочної залози. 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 (Hogeveen et al., 2019).

Мастит великої рогатої худоби можна поділити на три класи, в залежності від ступеня запалення, а саме: клінічний, субклінічний і хронічний. Клінічний мастит легко виявляється за наочними ознаками, таким як червоне і опухле вим'я і лихоманка у дійної корови. Молоко у корови набуває водянистої консистенції, з пластівцями та згустками (Zigo et al., 2021). Клінічний мастит поділяють на гострий і підгострий, в залежності від ступеня запалення (Kibebew, 2017). Важкі випадки клінічного маститу також можуть привести до летального випадку (Khasarane et al., 2021). 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) (Abebe et al., 2016). Втрати, спричинені субклінічним маститом, дуже важко визначити кількісно. Експерти сходяться на тому, що субклінічний мастит призводить до більших фінансових втрат в стаді, ніж клінічні випадки (Klaas & Zadoks, 2018; Rohmeier et al., 2020). Також хронічний мастит – це тривалий запальний процес, з нерегулярними клінічними загостреннями.

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.*) (Shkromada et al., 2019; Cheng & Han, 2020).

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 не менш важливим є той факт, що найбільше 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 у процесі доїння, проведення дезінфекції сосків після доїння, технічне обслуговування доїльних апаратів, є загальними заходами щодо запобігання нових випадків маститу. Однак лікування активної інфекції маститу залежить в основному від антибіотиків. На жаль масове застосування антибіотиків збільшило загрозу виникнення резистентних штамів мікроорганізмів (Guccione et al., 2020).

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.

Метою роботи було дослідження ефективності застосування пробіотичного штаму *Bacillus megaterium* ($1 \cdot 10^9$ КУО/г) для лікування субклінічного маститу корів.

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

Всі дослідні дії на великій рогатій худобі виконували 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 20.08.2021 року.

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 дослідження дійних корів на мастит використовували каліфорнійський тест (Bhulto et al., 2012) та мікроскопію для підрахунку кількості соматичних клітин (Prescott and Breed, 2010).

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

Результати й обговорення. Субклінічний мастит у корів відобразився у біохімічному дослідженні крові значним зниженням глобулінів, що вказує на ураження імунної відповіді у організмі (табл. 1). Вроджений і адаптивний імунітет координуються і діють разом дуже складними шляхами, щоб забезпечити оптимальний захист від інфекцій. Після контакту бактерій з лейкоцитами в молоці, що супроводжується проявом різних механізмів вірулентності і вивільненням токсинів, відбувається подразнення або навіть ураження епітелію і, таким чином відбувається активація клітинного імунітету через збудження транскрипції ключових генів відповіді (Ezzat Alnakip et al., 2014).

Однак, рівень альбумінів у контрольних та дослідних тварин був однаковий, тому нарікань на незбалансовану годівлю не може бути. Після завершення дослідного періоду у хворих на субклінічний мастит корів збільшується рівень загального білка на 36,67 % та глобулінів – на 75,11 %.

Таблиця 1

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

Загальний білок, г/ л	Альбу- міни, г/л	*Глобу- ліни, г/л	*Альбу- міни, %	*Глобу- ліни, %	*(А/Г), од	Сечовина, ммоль/л	*Азот сечо- вини, 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 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 (Zhang et al., 2020).

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, удій, анатомічні особливості, але в основному імунологічний стан і реактивність молочної залози (Shkromada et al., 2019). Через безліч внутрішніх і зовнішніх причин, що призводять до маститу, його слід розглядати як багатофакторне захворювання.

Перехідний період у корів зазвичай триває як період за три тижні до і через три тижні після пологів. Однак метаболічні зміни можуть початися завчасно мати важки 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 більше, ніж на 65 % для підтримки лактогенезу (Caixeta & Omontese, 2021). В цей період у корів суттєво підвищується ризик виникнення маститу.

За результатами досліджень рівень кальцію та фосфору був 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 Ca/P співвідношенням у організмі дійних корів (табл. 2).

Таблиця 2

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), од	Загальний Са, ммоль/л	Неорганіч. Р, ммоль/л	*Са/Р, од	КСК, тис/см ³	кМАФАнМ, 103 КУО/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 з розвитком субклінічного маститу, мають етіологію бактеріальних та стресових факторів. Лікування і профілактика маститу містить контроль кількості соматичних клітин, правильне харчування, утримання і догляд, доїння і сухостій в умовах молочного тваринництва (Smulski et al., 2020). 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, порушення обміну речовин, травми вимені і різні стресові фактори в розвитку маститу (Holko et al., 2019).

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 – на 51,33 %, порівняно до початку дослідження. Результати підтверджують відсутність токсичного впливу використаного пробіотику для лікування маститу. Крім того, доводять, що використання *Bacillus megaterium* (1*10⁹ КУО/г) в дозі 35 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» (Zajac et al., 2012).

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 гатунку «Вищий».

Враховуючи поліетіологічний характер субклінічного маститу і затримку в діагностиці та реєстрації, моніторингу та профілактиці на рівні стада, ветеринарні лікарі проводили 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 корів.

ВИСНОВКИ

1. Використання коровам із субклінічним маститом *Bacillus megaterium* ($1 \cdot 10^9$ КУО/г) в дозі 35 г на тварину сприяє зменшенню запалення вимені та нормалізації рівня метаболітів (АЛАТ і АСТ).

2. Пробиотик 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.

Перспективи досліджень. Визначити економічну ефективність від застосування *Bacillus megaterium* для профілактики субклінічного маститу корів голштинської породи.

References

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>

Bhulto, A.L., Murry, R.D., Woldehiwet, Z. (2012): California Mastitis Test scores as indicators of subclinical intramammary infections at the end of lactation in dairy cows. Res Vet Sci, 92, 13-17.

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>.

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>

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>

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>.

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.

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>

Kibebew, K. (2017). Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *J Biol Agric Healthc*, 7(2), 1-14.

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>

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>.

Prescott, S.C., Breed, R.S. (2010). The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *American J Pub Hyg*, 20, 662-640.

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>

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>

Shkromada, O., Skliar, O., Pikhtirova, A. & Inessa, G. (2019). Pathogens Transmission and Cytological Composition of Cow's Milk . *Acta Veterinaria Eurasia*, 45 (3). 73-79 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/actavet/issue/50595/608279>

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>

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>.

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>

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>