

2026

SCIENTIFIC

Progress & Innovations



Vol. 29
№2



Scientific Progress & Innovations

УДК 001

До 2022 року журнал виходив під назвою
«Вісник Полтавської державної аграрної академії».
У 2023 році журнал переєстровано та перейменовано
на «Scientific Progress and Innovation»

Засновник, редакція, видавець:

Полтавський державний аграрний університет.
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до
державного реєстру видавців, виготовлювачів і
розповсюджувачів видавничої продукції:

Серія ДК № 7933 від 13.09.2023 року

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого
засобу масової інформації:

Серія КВ № 25459-15399 ПР від 09.03.2023 року

Рік заснування: 1998

Мова видання:

українська, англійська

Рекомендовано до друку та поширення через мережу
Інтернет Вченою радою Полтавського державного
аграрного університету
(протокол № 13 від 24 червня 2026 року)

**Рішення Національної ради України
з питань телебачення і радіомовлення № 1554**

Ідентифікатор медіа – R30-03924

**Науковий журнал включено до категорії Б Переліку
наукових фахових видань України,**

у яких можуть публікуватися результати
дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів
доктора наук, кандидата наук та доктора філософії з
сільськогосподарських, ветеринарних та технічних
наук (наказ Міністерства освіти і науки України
№ 928 від 11.06.2026 р.)

КЛАСТЕР: Сільськогосподарські і ветеринарні науки

Спеціальності:

H1 Агрономія

H2 Тваринництво

H6 Ветеринарна медицина

H7 Агроінженерія

**Журнал представлено у міжнародних
наукометричних базах даних, репозитаріях та
пошукових системах:**

Index Copernicus International, Bielefeld Academic Search Engine
(BASE), Directory of open access scholarly resources (ROAD),
Національна бібліотека України імені В.І.Вернадського,
Національна наукова сільськогосподарська бібліотека НААН,
Scientific & Scholarly Research Database (Scilit), Dimensions, Open
Ukrainian Citation Index (OUCI), Google Scholar, Fatcat, Wikidata,
Crossref, Електронний репозитарій Полтавського державного
аграрного університету

Адреса редакції:

Полтавський державний аграрний університет,
36003, вул. Сковороди, 1/3, м. Полтава, Україна
e-mail: visnyk@pdau.edu.ua
http://www.pdau.edu.ua
https://doi.org/10.31210

© Полтавський державний аграрний університет

UDC 001

Until 2022, the journal was published under the name
“Bulletin of Poltava State Agrarian Academy”.

In 2023, the journal was re-registered and renamed
“Scientific Progress and Innovation”

Founder, Editorial and Publisher:

Poltava State Agrarian University
Certificate of making a publishing house subject to the state
register of publishers, manufacturers and distributors of
publishing products:

Series DC No. 7933 of September 13, 2023

Certificate of state registration print mass media:
Series KV No. 25459-15399 PR of March 09, 2023

Year of foundation: 1998

Language edition:

Ukrainian, English

Recommended for printing and distribution via the Internet
by the Academic Council of Poltava State Agrarian
University
(Minutes No. 13 of June 24, 2026)

**Decision of the National Council
of Television and Radio Broadcasting of Ukraine No. 1554**

Media identifier – R30-03924

**The scientific journal is included in category B
of the List of scientific professional publications of
Ukraine,**

in which the results of thesis papers for Doctor
of Sciences, Candidate of Sciences, and Ph.D
degrees in agricultural, veterinary, and technical sciences
(Order of the Ministry of Education and Science of Ukraine
No. 928 of June 11, 2026)

CLUSTER: Agricultural and Veterinary Sciences

Specialties:

H1 Agronomy;

H2 Animal Husbandry;

H6 Veterinary Medicine;

H7 Agricultural Engineering.

**The journal is presented international
scientometric databases, repositories
and scientific systems:**

Index Copernicus International, Bielefeld Academic Search Engine
(BASE), Directory of open access scholarly resources (ROAD),
Vernadsky National Library of Ukraine, National Scientific
Agricultural Library, Scientific & Scholarly Research Database
(Scilit), Dimensions, Open Ukrainian Citation Index (OUCI), Google
Scholar, Fatcat, Wikidata, Crossref, Electronic repository of Poltava
State Agrarian University

Editorial address:

Poltava State Agrarian University,
36003, 1/3, Skovorody str., Poltava, Ukraine
e-mail: visnyk@pdau.edu.ua
http://www.pdau.edu.ua
https://doi.org/10.31210

© Poltava State Agrarian University

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

Засновано 10 грудня 1998 р.

Періодичність випуску: 4 рази на рік

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Головний редактор

Віталій МЕЛЬНИЧУК, д. вет. наук (Україна)

Заступник головного редактора

Анатолій ШОСТЯ, д. с.-г. наук (Україна)

ЧЛЕНИ РЕДАКЦІЙНОЇ КОЛЕГІЇ

Сергій ГОНЧАРОВ, д. вет. наук (Україна)
Микола МАРЕНИЧ, д. с.-г. наук (Україна)
Ігор ЮСКІВ, д. вет. наук (Україна)
Валентина ЄВСТАФ'ЄВА, д. вет. наук (Україна)
Руслан СУСОЛ, д. с.-г. наук (Україна)
Павло ПИСАРЕНКО, д. с.-г. наук (Україна)
Фірас АЛАЛІ, д. філос. з вет. паразитології (Ірак)
Володимир ГАНГУР, д. с.-г. наук (Україна)
Юлія ГОРЮК, д. вет. наук (Україна)
Вадим ЛИХАЧ, д. с.-г. наук (Україна)
Валентин КАРПОВСЬКИЙ, д. вет. наук (Україна)
Світлана УСЕНКО, д. с.-г. наук (Україна)
Микола ПОВОД, д. с.-г. наук (Україна)
Олександр ЦИЛЮРИК, д. с.-г. наук (Україна)
Віктор ПИСАРЕНКО, д. с.-г. наук (Україна)
Марва ДЖАВАД, д. філос. з молек. біології (Ірак)
Павло ВАЩЕНКО, д. с.-г. наук (Україна)
Сергій КУЛИНИЧ, д. вет. наук (Україна)
Олександр КУЦ, д. с.-г. наук (Україна)
Сергій НИЧИК, д. вет. наук (Україна)
Микола БОГАЧ, д. вет. наук (Україна)
Онур ДЖЕЙЛАН, д. філос. з вет. медицини (Туреччина)
Олег КРУЧИНЕНКО, д. вет. наук (Україна)
Оксана БРЕЗВИН, д. вет. наук (Україна)
Антоніна ПАНФІЛОВА, д. с.-г. наук (Україна)
Станіслав КОВАЛЬЧУК, д. тех. наук (Україна)
Віктор ШЕЙЧЕНКО, д. тех. наук (Україна)
Іван МОСТОВ'ЯК, д. с.-г. наук (Україна)
Тетяна КОТ, д. вет. наук (Україна)
Вадим БРЕДИХІН, д. тех. наук (Україна)
Лукаш ГЕЖ, д. тех. наук (Польща)
Сергій ХАРЧЕНКО, д. тех. наук (Україна)
Михайло ШУЛЯК, д. тех. наук (Україна)
Владислав ЗУБКО, д. тех. наук (Україна)

Назва, концепція, зміст і дизайн «Scientific Progress & Innovations» є інтелектуальною власністю Полтавського державного аграрного університету та охороняються Законом України «Про авторські та суміжні права». Матеріали друкуються мовою оригіналу. У разі передруковування посилання на «Scientific Progress & Innovations» є обов'язковим.

Редакція залишає за собою право на редагування текстів, яке не змінює позиції автора.
Автор несе відповідальність за фактичний виклад матеріалу.

SCIENTIFIC JOURNAL

Year of establishment: Since December 10, 1998.

Publication frequency: 4 times a year

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief

Vitalii MELNYCHUK, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)

Deputy Chief Editor

Anatoliy SHOSTIA, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)

MEMBERS OF THE EDITORIAL COUNCIL

Serhii HONCHAROV, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)
Mykola MARENYCH, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Igor YUSKIV, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)
Valentyna YEVSTAFIEVA, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)
Ruslan SUSOL, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Pavlo PYSARENKO, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Firas ALALI, PhD in Veterinary Parasitology (Iraq)
Volodymyr HANHUR, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Yuliia HORIUK, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)
Vadym LYKHACH, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Valentyn KARPOVSKIY, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)
Svitlana USENKO, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Mykola POVOD, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Olexander TSYLIURYK, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Viktor PYSARENKO, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Marwa JAWAD, PhD in Molecular Biology (Iraq)
Pavlo VASHCHENKO, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Serhii KULYNYCH, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Oleksandr KUTS, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Serhiy NYCHYK, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)
Mykola BOGACH, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)
Onur CEYLAN, PhD in Veterinary Medicine (Turkey)
Oleh KRUCHYNNENKO, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)
Oksana BREZVYN, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)
Antonina PANFILOVA, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Stanislav KOVALCHUK, Dr. Tech. Sci. (Ukraine)
Viktor SHEICHENKO, Dr. Tech. Sci. (Ukraine)
Ivan MOSTOVIK, Dr. Agr. Sci. (Ukraine)
Tetiana KOT, Dr. Vet. Sci. (Ukraine)
Vadym BREDYKHIN, Dr. Tech. Sci. (Ukraine)
Łukasz GIERZ, Dr. Tech. Sci. (Poland)
Serhii KHARCHENKO, Dr. Tech. Sci. (Ukraine)
Mykhailo SHULYAK, Dr. Tech. Sci. (Ukraine)
Vladyslav ZUBKO, Dr. Tech. Sci. (Ukraine)

The title, conception, content, and design of the «Scientific Progress & Innovations» are intellectual property of Poltava State Agrarian University and are protected by the Law of Ukraine «On Copyright and Related Rights.» Materials are published in original language. In case of reprinting, the reference to the «Scientific Progress & Innovations» is compulsory.

Editorial stuff reserves the right to edit the texts without changing author's attitude.
The author is responsible for the factual account of material.

**Сільське господарство.
Рослинництво****6**

Тоцький В. М., Гангур В. В., Поляков І. А., Черниш М. Р. Особливості росту та розвитку гібридів соняшнику за різних погодних умов та рівнів живлення	6
Осіпов М. Ю. Особливості стерилізації експлантів <i>Hydrangea</i> L. за введення в культуру <i>in vitro</i>	13
Андрейченко О. Г. Вплив застосування мікродобрив на формування продуктивності соняшнику	17
Гамаюнова В. В., Бакланова Т. В., Гирля Л. М. Урожайність соняшнику залежно від попередника, удобрення та передпосівної обробки насіння	22

**Agriculture.
Plant growing**

Totskyi V., Hanhur V., Poliakov I., Chernysh M. Features of growth and development of sunflower hybrids under different weather conditions and nutrition levels	
Osipov M. Peculiarities of the sterilization of <i>Hydrangea</i> L. explants during introduction into <i>in vitro</i> culture	
Andreichenko O. The effect of microfertilizer application on sunflower yield	
Hamaiunova V., Baklanova T., Hyrlya L. Formation of sunflower yield depending on the preceding crop, fertilization background, and pre-sowing seed treatment	

**Сільське господарство.
Тваринництво****28**

Шейко В. А. Інтегрована оцінка відтворювальної здатності вівцематок різного генетичного походження з урахуванням показників благополуччя	28
Притика Д. В., Дереза Ю. Ф., Шостя А. М., Усенко С. О., Кузьменко Л. М., Слинько В. Г., Іжболдіна О. О., Маховий О. Г., Морозов В. Р., Корсаков С. В., Пруненко В. О. Поведінкові реакції, благополуччя і продуктивність свиноматок за використання різних систем утримання у період лактації	34

**Agriculture.
Animal breeding**

Sheiko V. Integrated assessment of the reproductive performance of ewes of different genetic origins considering animal welfare indicators	
Prytyka D., Dereza Y., Shostia A., Usenko S., Kuzmenko L., Slynko V., Izhboldina O., Makhovyi O., Morozov V., Korsakov S., Prunenko V. Behavioral reactions, welfare and productivity of sows using different holding systems during lactation	

Ветеринарна медицина**48****Veterinary medicine**

Канівець Н. С., Бурда Т. Л., Зарицький С. М., Каришева Л. П., Супруненко К. В. Лабораторна діагностика хронічної хвороби нирок у свійських собак	48
Брезвин О. М., Висоцький А. О., Гутій Б. В., Рудик Г. В. Вивчення гострої токсичності препарату «СЕКОБРЕН» за умови внутрішньошлункового введення лабораторним щурам	54
Натяглій О. М. Діагностична ефективність способів копроовоскопії під час виявлення яєць стронглід травного тракту у овець	60
Аль-Зухайрі А. Х. Ефективність комерційної інактивованої тривалентної вакцини проти ящуру у місцевих кіз провінції Діяла, Ірак	65
Яценко І., Абузнайд Р. С. К., Бінкевич В., Бібен І., Савчук Л., Добровольський В., Кравченко Н. Методологічні підходи до краніоскопічного дослідження чистокровних арабських коней у контексті судово-ветеринарної експертизи	70
Латухін О. Є. Клініко-біохімічне обґрунтування застосування крем-гелю «Іруветол» у лікуванні випадкових гнійних ран у коней	78
Мохамед В. М., Ібрагім І. Е., Мохаммед А. А. Екстракт гвоздики (<i>Syzygium aromaticum</i>) як натуральний біоконсервант у молоці: антимікробна та органолептична оцінка	86
Алі Х. І. Епідеміологія та антимікробна резистентність домінуючих серотипів <i>Salmonella</i> в бройлерних інкубаторах Іраку: комплексний аналіз «Єдиного здоров'я»	95
Фещенко Д. В., Довгій Ю. Ю., Березовський А. В., Згозінська О. А. Оцінка ефективності Бровітакоциду проти <i>Eimeria</i> spp. у природно інвазованих курчат-бройлерів	102
Асвад Ш. А. М. Порівняльний аналіз профілів експресії генів <i>gliP</i> та <i>cyp51A</i> в ізолятах <i>Aspergillus fumigatus</i> від курей та зі зразків корму для птиці	109
Буднік Т. С., Гуральська С. В., Пінський О. В., Заїка С. С., Хоменко З. В. Клініко-морфологічні особливості ліпофібром у собак на тлі дисліпідемії	115
Аззаві Е. А.-А. Патоморфологічне дослідження мишей за експериментального зараження <i>Aspergillus fumigatus</i>	123
Станков М. М. Жирнокислотний склад м'яса та яєць перепелів за застосування кормової добавки на основі гумінових речовин	130
Мельничук В. В., Євстаф'єва В. О., Щербаківа Н. С. Економічна та лікувальна ефективність специфічної і комплексної терапії собак за цистоізо스포зії	135
Ахмед Н. М., Юніс Н. А. С., Насер Р. А. А. Розвиток та гістохімічне дослідження репродуктивної системи самок собак у постнатальний період	141
Абдулхуссейн С. Р., Хуссейн Р. А., Хасан М. А. Фенотипове визначення біоплівки <i>Serratia</i> та <i>Staphylococcus aureus</i> , виділених від великої рогатої худоби з клінічним та субклінічним маститом у провінції Діяла	150

Kanivets N., Burda T., Zarytskyi S., Karysheva L., Suprunenko K. Laboratory diagnosis of chronic kidney disease in dogs	
Brezvyn O., Vysotskyi A., Gutij B., Rudyk H. Study of the acute toxicity of the preparation «SEKOBREN» following intragastric administration to laboratory rats	
Natiahlyi O. Diagnostic efficiency of coproovoscopy methods in the detection of strongylid eggs in the digestive tract of sheep	
Al-Zuhairi A. H. Potency of a commercial inactivated trivalent foot-and-mouth disease vaccine in local goats of the Diyala Governorate, Iraq	
Yatsenko I., Abuznaid R. S. K., Binkevych V., Biben I., Savchuk L., Dobrovolskyi V., Kravchenko N. Methodical approaches to cranioscopic study of purebred Arabian horses in the context of forensic veterinary examination	
Latukhin O. Clinical and biochemical substantiation of Iruvetol cream-gel application in the treatment of accidental purulent wounds in horses	
Mohamed W. M., Ibrahim I. E., Mohammed A. A. Clove (<i>Syzygium aromaticum</i>) extract as a natural bio-preservative in milk: Antimicrobial and organoleptic evaluation	
Ali H. I. Epidemiology and antimicrobial resistance of dominant <i>Salmonella</i> serotypes in Iraqi broiler hatcheries: a comprehensive One Health analysis	
Feshchenko D., Dovhiy Yu., Bereзовskyi A., Zghozinska O. Assessment of Brovitacoccid efficacy against <i>Eimeria</i> spp. in naturally infected broiler chickens	
Aswad S. A. M. Comparative expression profiling of <i>gliP</i> and <i>cyp51A</i> genes in <i>Aspergillus fumigatus</i> isolates from chickens and poultry feed.	
Budnik T., Huralska S., Pinskyi O., Zaika S., Khomenko Z. Clinical and morphological features of lipofibromas in dogs with dyslipidemia	
Azzawi E. A.-A. Histopathological study in mice infected experimentally with <i>Aspergillus fumigatus</i>	
Stankov M. Fatty acid composition of quail meat and eggs following dietary supplementation with a humic-based feed additive	
Melnychuk V., Yevstafieva V., Shcherbakova N. Economic and therapeutic efficacy of specific and complex therapy of dogs for cystoisosporiasis	
Ahmed N. M., Younis N. A. S., Naser R. A. A. Developmental and histochemical study of the reproductive system in female dogs during the postnatal period	
Abdulhussain S. R., Hussein R. A., Hasan M. A. Phenotype detection of biofilm from <i>Serratia</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from clinical and subclinical mastitis of bovine in Diyala governorate	

Хусейн М. А. Протективний ефект муміє проти індукованих бісфенолом А патоморфологічних змін у легенях самців мишей	161	Hussein M. A. Protective effect of Shilajit against Bisphenol A-induced pulmonary histopathological alterations in male mice
Рашид Я. М., Гаріб С. Г., Махмуд М. Ю. Вплив сезонних коливань на успішність запліднення кобил у період першої післяродової охоти в Іраку	168	Rasheed Y. M., Ghareeb S. H., Mahmood M. Y. Impact of seasonal variation on foal estrus breeding success in mares in Iraq
Аль-Талабані З. А. А. Молекулярна детекція та описова епідеміологія інфекції пташиного аденовірусу у курей-бройлерів	174	Al-Talabani Z. A. A. Molecular detection and descriptive epidemiology of fowl adenovirus infection in broiler chickens
Абдулла А. К., Харран О. Х. Молекулярні основи варіабельності фертильності кріоконсервованої сперми бугаїв: функціональна оцінка та аналіз експресії генів <i>IZUMO1</i> , <i>PLCζ</i> та <i>CatSper</i>	183	Abdulla A. K., Harran O. H. Molecular basis of fertility variation in cryopreserved bull semen: Functional evaluation and expression analysis of <i>IZUMO1</i> , <i>PLCζ</i> , and <i>CatSper</i> genes
Есмаел Г. Х. Порівняльне дослідження нативних і кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин щурів: життєздатність клітин, експресія імунологічних генів і продукція цитокінів	193	Esmail G. K. Comparative study of fresh and cryopreserved rat mesenchymal stem cells: cell viability, immunological gene expression, and cytokine production
Технічні науки		Technical sciences
Падалка В. В., Горбенко О. В., Кулик М. І., Чумак М. В. Визначення нижчої теплоти горіння зразків рослинного походження засобами з елементами мехатронних систем	205	Padalka V., Gorbenko O., Kulyk M., Chumak M. Determination of the lower calorific value of biomass using mechatronic system elements
Іванов О. М. Теплотехнічні аспекти автоматичного регулювання тепловологічного стану теплоносія у зерносушарках шахтного типу	211	Ivanov O. Heat engineering aspects of automatic control of the heat-moisture state of the heat carrier in shaft-type grain dryers
Макарець В. В., Ікальчик М. І., Хропост В. І., Кушніренко А. Г. Налаштування ПІД-регулятора частоти обертання вала відбору потужності трактора за допомогою методу рою часток	218	Makarets V., Ikalchik M., Khropost V., Kushnirenko A. Tuning of PID controller for tractor power take-off shaft rotational speed using particle swarm optimization method

Features of growth and development of sunflower hybrids under different weather conditions and nutrition levels

V. Totskyi¹ | V. Hanhur² | I. Poliakov² | M. Chernysh²

Article info

Correspondence Author

V. Hanhur

E-mail:

volodymyr.hanhur@pdau.edu.ua

¹ Poltava State Agricultural Experimental Station named after M.I. Vavilov of Institute of Pig Breeding and agroindustrial production of NAAS, Shvedska Str., 86, 36014, Ukraine

² Poltava State Agrarian University, Skovoroda Str., 1/3, Poltava, 36000, Ukraine

Citation: Totskyi, V., Hanhur, V., Poliakov, I., & Chernysh, M. (2026). Features of growth and development of sunflower hybrids under different weather conditions and nutrition levels. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 6–12. doi: 10.31210/spi2026.29.02.01

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the most important and economically viable crops in Ukraine's modern agricultural sector. It holds a leading position in the global vegetable oil market in terms of production scale and export potential. The research aimed to theoretically support and experimentally confirm the effectiveness of different fertilizer schemes for sunflower hybrids in the conditions of the Left-Bank Forest-Steppe. The study was conducted in 2024–2025 at the experimental field of the Poltava State Agricultural Research Station named after M. I. Vavilov. It was found that weather conditions during the research years significantly differed from the long-term average values and were characterized by frequent air temperature fluctuations and atmospheric precipitation deficit. Analysis of morphometric parameters has shown that plant growth and development largely depended on a combination of hydrothermal conditions and the mineral nutrition system of sunflowers. It was found that, on average, in 2024–2025, the height of plants in the variants with fertilizer application was 137–156 cm, which was 2–10 cm higher than the control (without fertilization). The highest plant height was observed in plants of hybrid Azart and Khoriv, which were treated with a combination of mineral fertilizers at a rate of $N_{16}P_{16}K_{16}$ and foliar application of Yarilo Super Azot (4 l/ha) and urea solution (8 kg/ha) at the 5–6 leaf pair stage. It was found that the use of mineral fertilizers and foliar applications contributed to an increase in the leaf area and basket diameter. The maximum leaf area ranged from 37.5 to 42.6 dm² per plant, exceeding the control variant by 18.7–39.6 %. The largest basket diameter was observed in hybrid Azart (up to 17.1 cm) when mineral fertilizers and foliar application were used in combination. The results confirm the effectiveness of combining mineral fertilizer application with foliar application to optimize the growth, development, and yield components of sunflower hybrids under conditions of unstable water supply.

Keywords: sunflower, hybrid, fertilizers, plant height, leaf area, basket diameter.

Особливості росту та розвитку гібридів соняшнику за різних погодних умов та рівнів живлення

В. М. Тоцький¹ | В. В. Гангур² | І. А. Поляков² | М. Р. Черниш²

¹ Полтавська державна сільськогосподарська дослідна станція ім. М. І. Вавилова Інституту свинарства і АПВ НААН України, м. Полтава, Україна

² Полтавський державний аграрний університет, м. Полтава, Україна

Соняшник (*Helianthus annuus* L.) є однією з найбільш важливих та економічно привабливих культур у сучасному аграрному секторі України. Йому належать провідні позиції на світовому ринку рослинних олій як за масштабами виробництва, так і за рівнем експортного потенціалу. Метою досліджень було теоретичне обґрунтування та експериментальне підтвердження ефективності різних схем удобрення гібридів соняшнику в умовах Лівобережного Лісостепу. Дослідження проведено впродовж 2024–2025 рр., на дослідному полі Полтавської ДСГДС ім. М. І. Вавилова. Встановлено, що погодні умови протягом років досліджень істотно відрізнялися від середніх багаторічних значень і характеризувалися частими перепадами температури повітря та дефіцитом атмосферних опадів. Аналіз морфометричних показників показав, що ріст і розвиток рослин значною мірою залежали від поєднання гідротермічних умов і системи мінерального живлення соняшника. Виявлено, що у середньому за 2024–2025 рр. висота рослин на варіантах із застосуванням мінеральних добрив становила 137–156 см, що на 2–10 см перевищувало контроль (без добрив). Максимальну висоту рослин формували гібриди Азарт і Хорив за поєднання припосівного внесення мінеральних добрив у дозі $N_{16}P_{16}K_{16}$ із позакореневим підживленням посівів препаратом Ярило Супер Азот (4 л/га) та розчином карбаміду (8 кг/га) у фазі 5–6 пар листків. Встановлено, що застосування мінеральних добрив і позакореневих підживлень сприяло збільшенню площі листової поверхні та діаметра кошика. Максимальна площа листової поверхні становила 37,5–42,6 дм² на рослину, що на 18,7–39,6 % більше відносно контрольного варіанту. Найбільший діаметр кошика сформував гібрид Азарт (до 17,1 см) за комплексного застосування мінерального удобрення та листового підживлення рідким комплексним азотним добривом Ярило Супер Азот (4 л/га).

Ключові слова: соняшник, гібрид, добрива, висота рослин, площа листової поверхні, діаметр кошика.



Бібліографічний опис для цитування: Тоцький В. М., Гангур В. В., Поляков І. А., Черниш М. Р. Особливості росту та розвитку гібридів соняшнику за різних погодних умов та рівнів живлення. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 6–12.

Вступ

Кліматичні зміни, які спостерігають впродовж останніх років на Полтавщині набувають екстремального характеру, через що у період вегетації посіви соняшнику нерідко зазнають впливу абіотичних стресів. Аналіз динаміки формування продуктивності культури дає підстави стверджувати, що ключовим обмежувальним чинником як на сучасному етапі, так і в найближчій перспективі залишатиметься дефіцит ґрунтової вологи та атмосферних опадів. Дослідженнями на державних метеостанціях встановлено, що на врожайність соняшнику вирішальний вплив має не так загальна сума опадів за вегетацію ($r=0,534$), як показник мінімальної відносної вологості повітря у фазі цвітіння ($r=0,855$) [1]. При цьому вологість повітря та ґрунту перебуває у прямій детермінованій залежності від рівня температурного режиму.

Екстремально високі температури під час вегетації польових культур є головним чинником стримування ростових процесів. За даними Н. М. Кутіщевої та співавторів (2019), варіювання висоти рослин залежно від гідротермічних умов року становило 52,1–62,5 %. Критичним періодом для формування високої продуктивності та якості насіння є етап «бутонізація–цвітіння». Мінливість погодних умов у цей міжфазний період істотно корелює як з рівнем урожайності насіння, так і з показниками його олійності. Крім того, на загальну якість врожаю значно впливає сума ефективних температур у поєднанні з вологозабезпеченістю, що комплексно відображається через гідротермічний коефіцієнт (ГТК) [3].

У досліджах Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН виявлено, що за посушливих умов впродовж періоду від сходів до цвітіння гібриди з максимальною площею листової поверхні забезпечують вищу насінневу продуктивність окремої рослини. Водночас у роки з надмірним зволоженням кореляція між площею листків та врожайністю нівелюється, зокрема, це пояснюється тим, що надлишкове наростання вегетативної маси не призводить до пропорційного збільшення продуктивності [4]. Окрім кліматичних чинників, також зниження активності ростових процесів виникає внаслідок абіотичних стресів, зумовлених недостатніми запасами макро- і мікроелементів у ґрунті.

Результати польових експериментів підтверджують, що збалансована система удобрення є ефективним прийомом підвищення адаптивності соняшнику до екстремальних умов навколишнього природного середовища. Своєчасне планування системи мінерального живлення дозволяє превентивно підвищити стресостійкість культури. До найбільш дієвих заходів регулювання поживного режиму належать припосівне внесення добрив та позакореневі підживлення препаратами, елементний склад яких відповідає фізіологічним потребам рослин у конкретних фазах органогенезу. Застосування регуляторів росту на початкових етапах розвитку оптимізує процеси вегетації та мінімізує негативний вплив високих температур і дефіциту вологи [5].

Оптимізація мінерального живлення є ключовим чинником інтенсифікації ростових процесів соняшнику. Експериментальні дані, одержані в НДГ «Агрономічне» (Вінницький НАУ) на сірих опідзолених середньосуглинкових ґрунтах, свідчать, що внесення мінеральних добрив забезпечує збільшення висоти рослин на 8,0–12,0 см порівняно з контрольним варіантом [6]. В умовах Західного Полісся оптимізація стартового живлення шляхом застосування комплексного добрива YaraMila (8:24:24) забезпечила інтенсифікацію процесів лінійного росту рослин соняшнику. Завдяки збалансованому співвідношенню макроелементів та наявності фосфору у доступній формі, висота рослин збільшилася на 25–30 см порівняно з недобреним контролем.

Позакореневе підживлення також істотно корелює з біометричними параметрами культури. Зокрема, використання мікродобрива Еколист Моно Бор забезпечило приріст висоти на 2,4–8,8 см, при цьому максимальні значення цього показника відзначені у гібридів Асер КЛ (169,4 см) та Алькантара (173,9 см) [8]. Аналогічні результати досліджень отримано Львівською філією УкрНДПВТ ім. Л. Погорілого, де одноразове внесення суміші препаратів Гумілін стимул (3 л/га) + Ніватон бор (2 л/га) + Експерт Гроу (0,5 л/га) забезпечило підвищення висоти рослин на 2–16 см або 1,1–9,1 %. Дворазове обприскування посівів вищезазначеною комбінацією препаратів у фазах 3–4 та 6–8 пар справжніх листків виявилось ефективнішим, зумовивши збільшення висоти до 184–198 см (на 4,5–12,5 см більше за контроль) [9]. Дослідження, які проводилися на сірих лісових легкосуглинкових ґрунтах (ТОВ «Органік-Д») свідчать, що застосування регулятора росту Архітект у фазу 6–7 листків забезпечило приріст висоти на 2,1 см у фазу утворення кошика та на 8,1 см у фазу цвітіння [10].

За оптимального поживного режиму соняшник формує потужну асиміляційну поверхню площею 45–80 тис. м²/га [11]. Максимальні показники площі листків (72,8–73,9 тис. м²/га, що на 6–8 % вище за контроль) відмічено за використання для підживлення регулятора росту Церон (0,5 л/га) [12]. У дослідках на ґрунтах типу Luvisol (Польща) доведено, що поєднання мінерального азоту (60 та 90 кг/га) з позакореневим підживленням мікроелементами (В, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn) позитивно впливає на біометричні параметри окремих рослин, а також на урожайність і якість сім'янок соняшнику. Було відзначено, що позакореневе підживлення значно збільшило площу листя та діаметр кошика порівняно з внесенням азоту дозою N₆₀ кг/га [13].

Параметри генеративних органів також перебувають у прямій залежності від системи підживлення. За даними досліджень Л. М. Поташової (2024), використання препаратів Фолікур, Спліт, Архітект та Кальма дозволило досягти діаметра кошика 23,2–28,5 см у фазі достигання (проти 22,6 см на контролі). Додаткова бактеризація насіння сумішшю Біонорм Фосфор та Біонорм Азот на фоні мінеральних добрив сприяла збільшенню діаметра кошика гібридів НК Рокі та НК Delphi на 6,1–7,4 см [15]. Поряд із цим

важливим є також вибір форми азотних добрив. Так, дослідження, проведені в Туреччині, показали, що застосування сульфату амонію забезпечує більший діаметр кошика (19,4–21,2 см) порівняно з дією аміачної селітри або сечовини [16].

З огляду на вищевикладене, актуальним науковим завданням є комплексне вивчення впливу припосівного добрива та позакореневого підживлення (або їхнього поєднання) на ріст, розвиток і адаптивну стійкість соняшнику до стресових кліматичних чинників у зоні Лівобережного Лісостепу.

Мета дослідження

Мета досліджень – теоретичне обґрунтування та експериментальне підтвердження ефективності різних схем удобрення гібридів соняшнику в умовах Лівобережного Лісостепу.

Завдання дослідження – дослідити вплив фону мінерального живлення на тривалість міжфазних періодів та висоту рослин гібридів соняшнику; визначити вплив різних доз мінеральних добрив на елементи структури врожаю гібридів соняшнику різних біотипів.

Матеріали і методи

Дослідження проводилися впродовж 2024–2025 рр., на Полтавській державній сільськогосподарській дослідній станції ім. М. І. Вавилова ІС і АПВ НААН. Схема польового дослідження включала сівбу трьох гібридів соняшнику Голкіпер, Азарт, Хорив (оригінатор Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва) на фоні шести варіантів удобрення (1 – припосівне внесення $N_{16}P_{16}K_{16}$ (нітроамофоска); 2 – припосівне внесення $N_{16}P_{16}K_{16}$ (нітроамофоска) + позакореневе підживлення рослин карбамідом (8 кг/га фізичної ваги) у фазу 5–6 пар листків; 3 – припосівне внесення $N_{16}P_{16}K_{16}$ (нітроамофоска) + позакореневе підживлення рослин мікродобривом Ярило Суперзот (4 л/га) у фазу 5–6 пар листків; 4 – позакореневе підживлення рослин карбамідом (8 кг/га фізичної

ваги) у фазу 5–6 пар листків; 5 – позакореневе підживлення рослин мікродобривом Ярило Суперзот (4 л/га) у фазу 5–6 пар листків; 6 – без добрив (контроль).

Технологія вирощування соняшнику в досліді загальноприйнята для ґрунтово-кліматичної зони. Попередником соняшнику в досліді була пшениця озима. Посівна площа ділянки 56 м², а облікової 28,0 м². Сівбу гібридів соняшнику провели 25 квітня. Закладання польового експерименту, проведення обліків та спостережень здійснювали відповідно до загальноприйнятих методик, прийнятих у землеробстві та рослинництві.

Ґрунт земельної ділянки – чорнозем, типовий малогумусний. Клімат зони помірно-континентальний з нестійким зволоженням, холодною зимою і жарким, а часто й сухим літом. Середньобагаторічна температура повітря становить 8,4 °С, сума опадів – 508 мм. За вегетаційний період (травень – серпень) середня температура повітря складає 19,1 °С, а сума опадів – 214,5 мм.

Результати та їх обговорення

Погодні умови періоду вегетації в роки проведення досліджень відрізнялися від середніх багаторічних і виявилися в різній мірі несприятливими для росту й розвитку соняшнику. На початку вегетаційного періоду 2024 р., спостерігали значні перепади температури повітря, зокрема і до заморозків мінус 0,5 градуса. Температура повітря від сівби до сходів у середньому становила 16 градусів, а сума опадів – 10,6 мм. Разом із тим, запаси доступної вологи у метровому шарі ґрунту становили близько 150 мм, що сприяло одержанню одночасних, вирівняних сходів. Результати спостережень свідчать, що повні сходи гібридів Голкіпер, Азарт і Хорив з'явилися на 11–12 добу після сівби (*табл. 1*). У післясходовий період температура повітря дещо знизилася, і до третьої декади травня її середнє значення становило 13,5 градуса. За цей період випав незначний дощ – 4,4 мм.

Таблиця 1

Тривалість міжфазних періодів вегетації гібридів соняшнику, діб

Міжфазний період	Голкіпер			Азарт			Хорив		
	2024	2025	середнє	2024	2025	середнє	2024	2025	середнє
Сівба – сходи	11	12	12	12	13	13	11	12	12
Сходи – бутонізація	49	51	50	49	53	51	49	54	52
Бутонізація – цвітіння	16	17	17	20	18	19	18	18	18
Цвітіння – господарська стиглість	50	46	48	62	59	61	55	47	51
Вегетаційний період	115	114	115	131	130	131	122	119	121

У третій декаді травня температура повітря підвищилася і становила в середньому 20,5 градуса. У першій декаді червня вона продовжила зростати, досягнувши середнього значення 23,4 градуса, при цьому сума опадів становила лише 3,7 мм. За таких погодних умов ріст рослин соняшнику дещо уповільнився, що зумовлено дефіцитом вологи у верхньому

шарі ґрунту, де розміщена основна маса коренів молодих рослин. Проте випадання дощів у другій половині червня (39,9 мм) у поєднанні з оптимальними температурами сприяло покращенню стану рослин і проходженню ними міжфазних періодів, зокрема сходи–бутонізація, який у гібридів соняшнику тривав 49 діб.

Настання фази бутонізації у гібридів, що вивчали, відмічено 24–25 червня. На цей час середня висота рослин становила: у гібрида Голкіпер – 87 см, Азарт – 88 см, Хорив – 95 см (*табл. 2*). Середньодобовий

лінійний приріст рослин гібридів соняшнику за період сходи–бутонізація становив відповідно 1,7; 1,8 і 1,9 см.

Таблиця 2

Висота рослин гібридів соняшнику у фазі цвітіння залежно від системи удобрення, см

Варіанти удобрення (фактор В)	Гібриди (фактор А)								
	Голкіпер			Азарт			Хорив		
	2024	2025	середнє	2024	2025	середнє	2024	2025	середнє
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆	160	118	139	158	137	148	176	128	152
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆ + карбамід 8 кг/га	161	125	143	165	137	151	181	131	156
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆ + Ярило Супер Азот 4 л/га	162	122	142	166	138	152	180	132	156
Ярило Супер Азот 4 л/га	158	116	137	163	134	149	179	128	154
Карбамід 8 кг/га	158	118	138	156	131	144	175	128	152
Контроль (без добрив)	157	113	135	155	129	142	171	126	149
НІР _{0,95}	фактор А – 2,4–2,7 см; фактор В – 3,4–3,8 см; взаємодія факторів АВ – 5,9–6,6 см								

Після настання фази бутонізації ріст рослин прискорився, і щоденний добовий приріст вже становив відповідно 4,5; 3,6 та 4,6 см. На час настання фази цвітіння висота рослин гібридів Голкіпер, Азарт і Хорив досягла відповідно 159, 160 і 177 см. Водночас міжфазний період бутонізації–цвітіння тривав у гібридів відповідно 16, 20 і 18 діб.

У цей період і надалі до завершення періоду вегетації культури спостерігали майже повну відсутність атмосферних опадів на тлі підвищення температури повітря, яка інколи досягала 38 градусів. У середньому за вегетаційний період температура повітря становила 22,2 градуса. Гідротермічний коефіцієнт становив 0,21, тоді як середній багаторічний показник – 0,91. Незважаючи на такі несприятливі погодні умови, гібриди соняшнику показали задовільний рівень продуктивності.

В умовах вегетаційного періоду 2025 р., як і у попередньому, після сівби спостерігали різкі коливання температури повітря, фіксували заморозки до мінус 1,5°C. Середня температура повітря від сівби до появи сходів становила 13,7°C, а сума опадів – 8,1 мм. Завдяки помірним запасам продуктивної вологи в ґрунті (близько 100 мм) було одержано дружні сходи, які у гібридів Голкіпер, Азарт і Хорив з'явилися на 12–13 добу.

Після появи сходів температурний режим залишався майже незмінним до третьої декади травня. За цей період випали значні опади, загальна сума яких становила 51,7 мм. Достатня зволоженість ґрунту та оптимальна температура повітря у третій декаді травня (у середньому 20,9 °C) загалом сприяли активному росту та розвитку рослин соняшнику.

У першій декаді червня відзначено підвищення температури повітря, яка у середньому становила 23,2 °C. У другій і третій декадах червня, навпаки, відбулося її зниження – у середньому до 18,1 °C. Загальна сума опадів за червень становила лише 16,4 мм (лише 25,2 % від середнього багаторічного значення). Такий характер погодних умов зумовив пригнічення ростових процесів та проходження міжфазного періоду сходи–бутонізація, який тривав у гібридів Голкіпер, Азарт і Хорив відповідно 51, 53 і 54 доби.

Спостереження свідчать, що на час настання фази бутонізації середня висота рослин становила: у

гібрида Голкіпер – 84 см, Азарт – 90 см, Хорив – 97 см, а середньодобовий приріст висоти рослин за період сходи–бутонізація становив відповідно 1,6; 1,7 і 1,8 см.

Із настанням липня спостерігали значне підвищення температури повітря на тлі відсутності атмосферних опадів, що спричинило виникнення повітряної та ґрунтової посухи. Унаслідок цього рослини соняшнику перебували у пригніченому стані. Ріст і розвиток рослин у міжфазний період бутонізації–цвітіння відбувалися повільніше, ніж зазвичай, а середньодобовий лінійний приріст становив відповідно 2,1; 2,4 і 1,8 см.

Настання фази повного цвітіння у гібрида Голкіпер відзначено 14 липня, а у гібридів Азарт та Хорив – на чотири доби пізніше. Тривалість періоду бутонізації–цвітіння коливалася від 16 діб у гібрида Голкіпер до 18 діб у гібрида Хорив та 20 діб у гібрида Азарт. На час настання фази цвітіння середня висота рослин становила: Голкіпер – 119 см, Азарт – 134 см, Хорив – 129 см.

У другій і третій декадах липня випали дощі в сумі 64,3 мм (на 3,2 мм більше норми), що сприяло поліпшенню загального стану посівів соняшнику. Надалі, у серпні, відзначено опади в сумі 27,5 мм (норма 42,7 мм) та помірну температуру повітря (у середньому 20,5 °C), що сприяло активізації асиміляційного процесу та формуванню і наливу насіння соняшнику.

У середньому за вегетаційний період температура повітря становила 20,1 °C. Гідротермічний коефіцієнт становив 0,70, тоді як середнє багаторічне значення – 0,91.

Аналіз морфометричних показників соняшнику засвідчив, що динаміка росту та розвитку рослин визначалася поєднанням впливу гідротермічних умов вегетаційного періоду й системи живлення. У середньому за 2024–2025 рр. висота рослин гібридів соняшнику на варіантах із застосуванням добрив варіювала від 137 до 156 см, що на 2,0–10,0 см більше, порівняно з варіантом без добрив.

Максимальні лінійні розміри рослин формували гібриди соняшнику (Голкіпер 142–143 см, Азарт 151–152 см та Хорив 156 см), за поєднання припосівного внесення мінеральних добрив у дозі N₁₆P₁₆K₁₆ із

наступним позакореневим підживленням у фазу 5–6 пар листків мікродобривом Ярило Супер Азот (4 л/га) та розчином карбаміду (8 кг/га) (*табл. 2*).

Проведеними дослідженнями було виявлено помітний вплив варіантів удобрення на площу листової поверхні гібридів соняшнику (*табл. 3*).

Таблиця 3

Площа листової поверхні гібридів соняшнику у фазі цвітіння залежно від системи удобрення, дм² на одну рослину (середнє за 2024–2025 рр.)

Варіанти удобрення (фактор В)	Гібриди (фактор А)		
	Голкіпер	Азарт	Хорив
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆	34,7	39,2	40,0
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆ + карбамід 8 кг/га	37,8	42,6	41,3
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆ + Ярило Супер Азот 4 л/га	37,5	42,6	41,4
Ярило Супер Азот 4 л/га	34,1	37,9	37,5
Карбамід 8 кг/га	34,0	37,6	37,9
Контроль (без добрив)	31,6	30,5	31,4
НІР _{0,95}	фактор А – 1,2–2,0 дм ² ; фактор В – 1,7–2,8 дм ² ; взаємодія факторів АВ – 3,1–4,8 дм ²		

Максимальні значення показника спостерігали за умови поєднання припосівного внесення N₁₆P₁₆K₁₆ із позакореневим підживленням. Зокрема, у варіанті з внесенням N₁₆P₁₆K₁₆ та підживленням препаратом Ярило Супер Азот (4 л/га) площа листя на одну рослину становила 37,5–42,6 дм², що перевищує контроль на 18,7–39,6 % залежно від гібрида. Використання лише позакореневих підживлень (Ярило Супер Азот або карбамід) також стимулювало ріст вегетативної маси, однак ефективність таких заходів була нижчою порівняно з комплексним застосуванням припосівного удобрення та листового підживлення.

Результати свідчать про різну реакцію гібридів на мінеральне живлення. Так, гібриди Азарт та Хорив демонстрували найвищу здатність до

нарощування асиміляційної поверхні. У середньому за два роки у вищезазначених гібридів соняшнику їх площа на кращих варіантах удобрення варіювала в межах 41,3–42,6 дм²/рослину. Гібрид Голкіпер виявив меншу здатність до активного утворення листової поверхні, сформувавши її на рівні 37,5–37,8 дм².

У фазі фізіологічної стиглості визначали розмір кошиків гібридів соняшнику (*табл. 4*). Середні за 2024–2025 рр., результати досліджень свідчать, що система удобрення істотно впливає на формування діаметра кошика гібридів соняшнику. Встановлено, що застосування мінеральних добрив та позакореневих підживлень посівів сприяло збільшенню цього показника у всіх вивчених гібридів порівняно з контролем (без добрив).

Таблиця 4

Діаметр кошика гібридів соняшнику залежно від системи удобрення, г (середнє за 2024–2025 рр.)

Варіанти удобрення (фактор В)	Гібриди (фактор А)		
	Голкіпер	Азарт	Хорив
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆	14,7	16,6	15,1
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆ + карбамід 8 кг/га	15,2	17,0	15,2
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆ + Ярило Супер Азот 4 л/га	15,2	17,1	15,4
Ярило Супер Азот 4 л/га	14,5	16,4	15,0
карбамід 8 кг/га	14,5	16,3	15,0
контроль (без добрив)	14,2	15,2	14,2
НІР _{0,95}	фактор А – 0,3–0,4 см; фактор В – 0,4–0,5 см; взаємодія факторів АВ – 0,8–0,9 см		

У гібрида Голкіпер середній діаметр кошика на контрольному варіанті був найменшим і становив 14,2 см. Внесення мінеральних добрив у нормі N₁₆P₁₆K₁₆ забезпечило збільшення цього показника до 14,7 см. У разі поєднання основного удобрення із позакореневими підживленнями (карбамід 8 кг/га або Ярило Супер Азот 4 л/га) відзначено формування кошиків із діаметром 15,2 см, що на 7 % перевищувало контроль. Деяко нижчі значення цього показника (14,5 см) відмічено на варіантах із застосуванням лише позакореневих підживлень.

Дослідження свідчать, що гібрид Азарт відзначається найбільшим діаметром кошиків. На контрольному варіанті середній діаметр кошика становив 15,2 см. Внесення N₁₆P₁₆K₁₆ сприяло збільшенню його до 16,6 см, а поєднання основного удобрення з позакореневим підживленням карбамідом – до 17,0 см. Найбільше значення діаметра кошика (17,1 см) відзначено у варіанті з внесенням N₁₆P₁₆K₁₆ та під-

живленням посівів рідким комплексним азотним добривом Ярило Супер Азот 4 л/га. Застосування лише позакореневих підживлень забезпечувало деяко нижчі значення – 16,3–16,4 см, однак це на 7,2–7,9 % перевищувало контроль. Аналогічну тенденцію щодо зміни діаметра кошика залежно від фону живлення зафіксовано і в гібрида Хорив, проте з деяко нижчими абсолютними значеннями цього показника.

Таким чином, одержані результати досліджень свідчать про ефективність внесення мінеральних добрив як під час сівби, так і під час позакореневого підживлення просівів соняшнику у фазі 5–6 пар листків. Доцільність покращення мінерального живлення рослин соняшнику шляхом позакореневих підживлень підтверджують результати дослідів, проведених у Миколаївській області впродовж 2021–2023 рр. Так, встановлено, що застосування позакореневого підживлення позитивно вплинуло на висоту рослин, площу листової поверхні, кількість

насінин у кошику, урожайність насіння, а також вміст олії та олеїнової кислоти в насінні [17]. Як зазначає Ю. Домарацький із співавторами (2023), позакореневе підживлення діє як додатковий метод до кореневого підживлення, пропонуючи в деяких випадках більш економічно ефективне рішення. Цей метод забезпечує миттєве поглинання та розподіл поживних речовин у рослинах через листя, швидко усуваючи дефіцит поживних речовин. У дослідженні, проведеному Б. Ханом та ін. (2021), А. Олівейрою та ін. (2022) та Д. Нгуєном та ін. (2021), вивчався вплив Біополіну на рослини соняшнику. Спостереження виявили збільшення площі листків, що свідчить про позитивний вплив стимулюючих препаратів на ріст листової маси.

Висновки

За результатами досліджень, проведених у 2024–2025 рр., на Полтавській ДСГДС ім. М. І. Вавилова встановлено, що застосування припосівного внесення мінеральних добрив у дозі $N_{16}P_{16}K_{16}$ та позакореневого підживлення рідким комплексним азотним добривом Ярило Супер Азот 4 л/га у фазі 5–6 пар листків виявилося найбільш ефективним за впливом на лінійні розміри рослин, діаметр кошика та формування асиміляційної поверхні гібридів соняшнику Голкіпер, Азарт та Хорив.

Перспективи подальших досліджень полягають в оптимізації системи живлення рослин соняшнику з урахуванням забезпеченості ґрунту поживними речовинами та запланованого рівня насінневої продуктивності соняшнику.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Не застосовується.

Фінансування

Дослідження виконано за кошти державного бюджету України відповідно до угод між Полтавською державною сільськогосподарською дослідною станцією ім. М. І. Вавилова Інституту свинарства і АПВ НААН та Інститутом рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН: № 5П-24 від 19.02.2024 р. (обсяг фінансування – 63,5 тис. грн) та № 2П-25 від 03.02.2025 р. (обсяг фінансування – 65,9 тис. грн).

Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання III та технологій на основі III

Автори заявляють, що не використовували штучний інтелект або технології на основі III під час підготовки цього рукопису.

References

- Yeremenko, O. A., & Kalytko, V. V. (2017). Urozhainist soniashnyku zalezno vid ahrometeorolohichnykh umov Zaporizkoi oblasti [Sunflower productivity depending on agrometeorological conditions of Zaporizhzhia region]. *Naukovo-Tekhnichniy Biuletyn Instytutu Oliynykh Kultur NAAN*, 24, 156–165. (in Ukrainian)
- Kutishcheva, N. M., Shudrya, L. I., & Odinets, S. I. (2019). Variability of economic indicators in sunflower hybrids under the influence of environmental change. *Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Oilseed Crops NAAS*, 27, 59–68. <https://doi.org/10.36710/ioc-2019-27-07>
- Kokhan, A. V., Totskyi, V. M., Len, O. I., & Samoilenko, O. A. (2020). Sunflower yield depending on weather conditions and hybrid composition. *Scientific Papers of the Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet*, 28, 164–172. <https://doi.org/10.47414/np.28.2020.211069>
- Hanhur, V., & Kosminskyi O. (2023). Formation of the photosynthetic-active surface of sunflower hybrid plants depending on fertilizer standards. *Scientific Progress & Innovations*, 26(2), 5–9. <https://doi.org/10.31210/spi2023.26.02.01>
- Domaratsky, E. O., Dobrovolsky, A. V., Kozlova, O. P., Dobrovolsky, P. A., & Lavrishina, O. E. (2021). Ways of optimization of high oleic type sunflower consumption under climate change. *Agrarian Innovations*, 10, 32–41. <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2021.10.6>
- Hutsol, G., & Mazur, O. (2024). Sunflower growth and development depends on fertilizer. *Agriculture and Forestry*, 1(32), 62–75. Internet Archive. <https://doi.org/10.37128/2707-5826-2024-1-6>
- Furmanets, O. A. (2022). Development and productivity of sunflower on sod-podzolic soils of Western Polissia with the application of various types of complex fertilizers. *Agrarian Innovations*, 16, 78–83. <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2022.16.13>
- Biliuk, M. Yu., & Khomina, V. Ya. (2022). Biometric indicators and yield of sunflower hybrids of different maturity depending on fertilization with microfertilizers. *Taurian Scientific Herald*, 128, 17–21. <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2022.128.3>
- Klymchuk, M., & Dumych, V. (2021). Efficiency of fertilizer supplement of sunflower in the Western region of Ukraine. *Technical and Technological Aspects of Development and Testing of New Machinery and Technologies for Agriculture of Ukraine*, 28(42), 237–246. [https://doi.org/10.31473/2305-5987-2021-1-28\(42\)-20](https://doi.org/10.31473/2305-5987-2021-1-28(42)-20)
- Palamarchuk, V., & Krychkovskiy, V. (2025). Productivity of sunflower hybrids depends on foliar fertilization. *Foothill and Mountain Agriculture and Stockbreeding*, 78(1), 98–111. [https://doi.org/10.32636/01308521.2025-\(78\)-1-9](https://doi.org/10.32636/01308521.2025-(78)-1-9)
- Garbar, L. A., Dovbash, N. I., & Venger, V. V. (2022). Formation of leaf apparatus of sunflower hybrids and efficiency of its functioning under the influence of fertilizer. *Agrarian Innovations*, 13, 24–29. <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2022.13.3>
- Totskyi, V., Hanhur, V., & Poliakov, I. (2024). Yield and quality of seed of sunflower hybrids (*Helianthus annuus* L.) depending on the fertilizer system. *Scientific Progress & Innovations*, 27(3), 5–11. <https://doi.org/10.31210/spi2024.27.03.01>
- Jarecki, W. (2022). Effect of varying nitrogen and micronutrient fertilization on yield quantity and quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes. *Agronomy*, 12(10), 2352. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102352>
- Potashova, L. M., Chygrin, O. V., & Kalensky, A. P. (2024). Sunflower yield depends on application of fungicides and growth regulators in the Right Bank Forest Steppe of Ukraine. *Taurian Scientific Herald*, 2(135), 18–28. <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2024.135.2.3>
- Shkatula, Y. (2021). Effect of mineral fertilizers and biological preparations on sunflower productivity. *The Scientific Heritage*, 2(61), 13–20.
- Ozturk, E., Polat, T., & Sezek, M. (2017). The effect of sowing date and nitrogen fertilizer form on growth, yield and yield components in sunflower. *Turkish Journal of Field Crops*, 22(1), 143–151. <https://doi.org/10.17557/tjfc.312373>
- Panfilova, A., Drobitko, A., Markova, N., & Domaratskiy, Y. (2024). Influence of biological products on the productivity of high oleic sunflower hybrids. *Scientific Horizons*, 27(10), 91–101. <https://doi.org/10.48077/scihor10.2024.91>

18. Domaratskiy, Y., Kovalenko, O., Kachanova, T., Pichura, V., & Zadorozhnyi, Y. (2023). Analysis of the effectiveness of biological plant protection on sunflower productivity under different cenosis density in the non-irrigated conditions of the steppe zone. *Ecological Engineering & Environmental Technology*, 24(9), 45–54. <https://doi.org/10.12912/27197050/173004>
19. Han, B., Yu, N.-N., Zheng, W., Zhang, L.-N., Liu, Y., Yu, J.-B., Zhang, Y.-Q., Park, G., Sun, H.-N., & Kwon, T. (2021). Effect of non-thermal plasma (NTP) on common sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed growth via upregulation of antioxidant activity and energy metabolism-related gene expression. *Plant Growth Regulation*, 95(2), 271–281. <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00741-5>
20. de Oliveira, A. K. S., Soares, E. B., dos Santos, M. G., Lins, H. A., de Freitas Souza, M., dos Santos Coêlho, E., Silveira, L. M., Mendonça, V., Barros Júnior, A. P., & de Araújo Rangel Lopes, W. (2022). Efficiency of phosphorus use in sunflower. *Agronomy*, 12(7), 1558. <https://doi.org/10.3390/agronomy12071558>
21. Nguyen, D. T. C., Nguyen, T. T., Le, H. T. N., Nguyen, T. T. T., Bach, L. G., Nguyen, T. D., Vo, D.-V. N., & Van Tran, T. (2021). The sunflower plant family for bioenergy, environmental remediation, nanotechnology, medicine, food and agriculture: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(5), 3701–3726. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01266-z>

ORCID

- | | | |
|-------------|---|---|
| V. Totskyi |  | https://orcid.org/0009-0004-8867-0099 |
| V. Hanhur |  | https://orcid.org/0000-0002-5619-492X |
| I. Poliakov |  | https://orcid.org/0009-0000-0025-8253 |
| M. Chernysh |  | https://orcid.org/0009-0005-5010-1330 |



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Peculiarities of the sterilization of *Hydrangea* L. explants during introduction into *in vitro* culture

M. Osipov

Article info

Correspondence Author

M. Osipov

E-mail:

landscape1@meta.uaUman National University,
1 Instytutska Str., Uman,
20301, Ukraine**Citation:** Osipov, M. (2026). Peculiarities of the sterilization of *Hydrangea* L. explants during introduction into *in vitro* culture. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 13–16. doi: 10.31210/spi2026.29.02.02

This article examines the effectiveness of sterilizing agents and sterilization methods for *Hydrangea* explants during their introduction into *in vitro* culture. The starting material for *in vitro* culture consisted of microshoots with apical meristems excised from 3- to 5-year-old plants of *H. macrophylla* 'Nikko Blue', *H. arborescens* 'Annabelle', and *H. paniculata* 'Grandiflora'. It was established that the most effective sterilizing agent was a 0.1 % solution of mercuric chloride (HgCl₂). Its application with an exposure time of 1–1.5 min resulted in 67.2–85.5 % sterile microshoots, of which 62.8–73.3 % were viable. Increasing the exposure time to 2.0 min led to a decrease in explant viability to 54.7 %. The least effective sterilizing agent was 2.5 % sodium hypochlorite (NaOCl), which resulted in up to 55.8 % sterile explants across all exposure times. Treatment with a 1.0 % silver nitrate (AgNO₃) solution yielded a higher proportion of sterile explants compared to sodium hypochlorite; however, their viability was the lowest among all treatments. After 2 min of exposure, the proportion of sterile explants reached 72.8 %, but only 20.5 % remained viable. It was also found that explants of all studied species and cultivars of the genus *Hydrangea*, collected and introduced into *in vitro* culture in May, showed lower contamination levels; however, the proportion of sterile viable explants was significantly lower (19.4–20.6 %) compared to those collected and introduced into culture in July. It was determined that the highest yield of viable sterile explants was obtained when they were introduced into *in vitro* culture during July 5–25, with average values of 65.1–67.2 % for the studied species and cultivars of hydrangea, respectively. The lowest percentage of viable explants was observed when explants were introduced into culture on May 5, ranging from 17.9 % to 20.6 %. Meristem development, as well as the expression or suppression of totipotency, depended on the conditions under which the explants were introduced into *in vitro* culture. The best results were achieved by culturing sterilized plant material on a nutrient medium at an air temperature of 25±1°C, with a 16-hour photoperiod, a light intensity of 1–3 klx, and a relative humidity of 75 %.

Keywords: hydrangea, microshoots, viability, sterilizing agent, exposure.

Особливості стерилізації експлантів *Hydrangea* L. за введення в культуру *in vitro*

М. Ю. Осіпов

Уманський національний
університет,
м. Умань, Україна

У статті висвітлено питання вивчення ефективності стерилізаційних речовин та способів стерилізації експлантів гортезії при введенні в культуру *in vitro*. Вихідним матеріалом для введення в культуру *in vitro* були мікропагони з апікальною меристемою відібрані з 3–5-річних рослин *H. macrophylla* 'Nikko Blue', *H. arborescens* 'Annabelle', *H. paniculata* 'Grandiflora'. Визначено, що найефективнішим стерилізатором є розчин 0,1 % дихлориду ртуті (HgCl₂). Його застосування за експозиції 1–1,5 хв. забезпечило отримання 67,2–85,5 % стерильних мікропагонів, з яких 62,8–73,3 % були життєздатними. Збільшення часу стерилізації HgCl₂ до 2,0 хв. призвело до втрати життєздатності експлантів, яка становила 54,7 %. Найменш ефективним стерилізатором виявився 2,5 % гіпохлорит натрію (NaOCl), який забезпечив отримання до 55,8 % стерильних експлантів за всіх експозицій. Стерилізація експлантів у розчині 1,0 % нітрату срібла (AgNO₃) забезпечила отримання більшої кількості стерильних експлантів, ніж стерилізація в розчині гіпохлориту натрію, однак їхня життєздатність була найнижчою порівняно з іншими стерилізаторами. За стерилізації упродовж 2 хв. вихід стерильних експлантів становив 72,8 %, але лише 20,5 % було життєздатних. Виявлено, що живці всіх видів і сортів роду *Hydrangea*, відібрані та введені в культуру *in vitro* у травні, були менш заражені, але кількість стерильних життєздатних експлантів була значно меншою і становила від 19,4 до 20,6 %, порівняно з живцями, відібраними та введенними в культуру у липні. Визначено, що найвищий вихід життєздатних стерильних експлантів отримано при введенні їх у культуру *in vitro* 05–25 липня, який у середньому за видами та сортами гортезії становив 65,1–67,2 % відповідно. Найнижчою кількістю життєздатних експлантів була за введення в їх у культуру 05 травня та становила 17,9 та 20,6 %. Розвиток меристем, експресія або пригнічення тотипотентності залежали від умов, у які експланти потрапляли в культуру *in vitro*. Кращі результати отримано при висаджуванні стерилізованого рослинного матеріалу на живильне середовище і культивуванні за температури повітря 25±1 °C при 16-годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 1–3 клк та відносній вологості 75 %.

Ключові слова: гортезія, мікропагони, життєздатність, стерилізатор, експозиція.

Бібліографічний опис для цитування: Осіпов М. Ю. Особливості стерилізації експлантів *Hydrangea* L. за введення в культуру *in vitro*. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 13–16.

Вступ

Мікроклональне розмноження рослин є одним з перспективних напрямів сучасної біотехнології, що активно впроваджується у виробництво [1]. Перевагами розмноження *in vitro* є висока мультиплікативна здатність за відносно короткий проміжок часу, створення здорових та вільних від хвороб рослин і здатність генерувати пагони упродовж року [2, 3]. Основними факторами, що впливають на швидкість розмноження, є вік джерела експлантату, тип експлантату, склад середовища, вимоги до освітлення та частота пересадки [4, 5]. Асептичність експлантів має важливе значення для мікроклонального розмноження рослин [6]. Стерилізація вихідного матеріалу є важливим етапом розмноження *in vitro*, оскільки на поверхні рослин і їхніх частинах, пагонах, бруньках, проростках та інших джерелах експлантів знаходиться велика кількість різних мікроорганізмів, бактерій, грибів, які здатні рости і розмножуватися на живильному середовищі [7, 8]. За введення таких експлантів в культуру бактерії та гриби поглинають поживні речовини живильного середовища та виділяють токсини, які накопичуються в середовищі, гальмують ростові процеси в клітинах рослин і за тривалого впливу спричиняють їх загибель. Тому від якості стерилізації залежить успіх подальшого культивування [9, 10].

Ефективність стерилізувальної речовини залежить від її виду, концентрації, підготовки експлантів та тривалості експозиції. Крім цього, успішне проходження процесу залежить від щільності та чутливості тканини, що контактує із антисептиком [11, 12]. Під час добору стерилізуючих речовин необхідно враховувати їхню здатність ефективно пригнічувати розвиток мікроорганізмів за мінімального пошкодження рослинних тканин. Ці речовини мають легко видалятися із тканин рослини промиванням дистильованою водою або розкладатися, щоб запобігти отруєнню тканин [13, 14]. Не менш важливим є забезпечення стерильності не лише експлантів, а й поживного середовища, приміщення, посуду, інструментів і допоміжних матеріалів [15].

Дослідження *in vitro* десяти сортів *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. та двох сортів *Hydrangea paniculata* Siebold найкращі результати отримано при використанні твердого середовища Гамборга 0,5× у поєднанні зі сумішшю для консервування рослин (PPM) та стерилізацією насіння трихлор-*s*-триазинтріоном (Trichlor). Аналізи фізіології проводилися шляхом стерилізації насіння та обробки комбінаціями білого й червоного світла, холодом, гібереловою кислотою та нітратом калію, а також світлових циклів. Встановлено, що найсприятливіші умови для проростання насіння гортензії забезпечували обробка холодом упродовж шести тижнів, просочування GA_3 + KNO_3 та висів на середовище Гамборга половинної концентрації з доповненням GA_3 , у присутності білого світла [16].

У дослідженнях Sacco et al. [17] у якості експлантів було взято невеликі пагони та зачатки, які зрізалися у жовтні, квітні та травні з вегетативних гілок і стерилізувалися послідовно в етанолі, NaOCl,

дистильованій та стерильній воді. Для створення культур *in vitro* використовувалося сольове середовище MS з вітамінами, доданими до ВА ($0,5 \text{ мг л}^{-1}$) та сахарози (30 г л^{-1}).

Мета дослідження

Мета досліджень – визначення ефективних способів стерилізації експлантів гортензії за введення в культуру *in vitro* з подальшим підбором живильного середовища.

Матеріали і методи

Лабораторні дослідження проводили упродовж 2020–2024 років у Національному дендрологічному парку «Софіївка» НАН України. Як вихідний матеріал для введення в культуру *in vitro* використовували пагони з апікальною меристемою довжиною 1,0–1,5 см, взяті з 3–5-річних рослин. Дослідження проводили з представниками роду *Hydrangea*, зокрема: *H. macrophylla* 'Nikko Blue', *H. arborescens* 'Annabelle' та *H. paniculata* 'Grandiflora'. Перед стерилізацією експланти промивали у проточній воді, після цього їх занурювали у водний розчин стерилізатора та тричі ополіскували дистильованою водою. Для підвищення ефективності стерилізації до розчину додавали 1–2 краплі Твину-80. Розчин стерилізатора включав: 2,5 % гіпохлориту натрію (NaOCl), 0,1 % дихлориду ртуті (HgCl_2) та 1,0 % нітрату срібла (AgNO_3). Після промивання стерильною водою експланти висаджували на модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС).

Ефективність стерилізації визначали, підраховуючи кількість стерильних та інфікованих експлантів у кожному варіанті, упродовж семи діб. Життєздатність експлантів оцінювали через 25 діб.

Результати та їх обговорення

Дослідженнями Onica et al. [18] виявлено, що ефективність стерилізації рослин *H. macrophylla* залежала від стерилізуючого розчину та тривалості його застосування. За багатоетапної стерилізації з використанням етанолу, дихлорізоціанурату натрію (NaDCC , 0,2–2 %), перманганату калію та фунгіциду (Dithane) або дезінфікуючого засобу на основі хлору (Domestos) виявлено, що найбільш ефективною була стерилізація експлантів 0,2 % Dithane упродовж 7 хв. перед обробкою NaDCC . Багаторазове промивання та проміжне витримання у перманганаті калію виявилися критично важливими для поліпшення асептичних умов. За дослідження методики отримання стерильної культури *in vitro* *H. paniculata* виявлено, що найбільшу кількість життєздатних (92 %) експлантів отримано за послідовної обробки верхівкових та пазушних бруньок з весняних пагонів відростання у 3 % розчині перекису водню упродовж 3 хв. та 7 % розчині гіпохлориту натрію упродовж 4 хв. [19].

У результаті проведених досліджень визначено, що найефективнішим стерилізатором був розчин 0,1 % дихлориду ртуті (HgCl_2), який забезпечив

одержання найбільшої кількості стерильних мікропагонів – 67,2–85,5 % за експозиції 1–1,5 хв., з яких життєздатними були 62,8–73,3 %. Збільшення часу стерилізації HgCl_2 до 2,0 хв. призвело до втрати життєздатності експлантів. Частка життєздатних експлантів становила 54,7 % і вони були непридатні для подальшого культивування (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив стерилізації експлантів рослин роду *Hydrangea*

Розчин для стерилізації	Термін стерилізації, хв.	Кількість експлантів, %	
		стерильних	життєздатних
2,5 % гіпохлорит натрію (NaOCl)	1,0	0,5	0
	1,5	46,3	32,1
	2,0	55,8	43,4
0,1% дихлорид ртуті (HgCl_2)	1,0	67,2	62,8
	1,5	85,5	73,3
	2,0	85,6	54,7
1,0 % нітрат срібла (AgNO_3)	1,0	48,8	27,2
	1,5	57,3	31,2
	2,0	72,8	20,5

Найнижчу ефективність стерилізації отримано при використанні розчину 2,5 % гіпохлориту натрію (NaOCl) за всіх експозицій. Збільшення тривалості стерилізації від 1,0 до 2,0 хвилин сприяло збільшенню кількості стерильних експлантів з 0,5 до 55,8 %, але їхня життєздатність була дуже низькою та становила 43,4 %.

За стерилізації експлантів у розчині 1,0 % нітрату срібла (AgNO_3) отримано більшу кількість стерильних експлантів, ніж за стерилізації у розчині гіпохлориту натрію, однак їхня життєздатність була найнижчою порівняно з іншими стерилізаторами. За

Таблиця 2

Життєздатність стерильних експлантів залежно від строків введення, %

Вид, сорт	Дата введення в культуру							
	05.05.	10.05.	25.05.	30.05.	05.07.	10.07.	25.07.	30.07.
<i>H. macrophylla</i> 'Nikko Blue'	20,6	35,1	46,9	57,9	66,5	67,2	65,1	44,6
<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'	17,9	29,9	45,5	55,5	66,1	67,2	64,2	43,5
<i>H. paniculata</i> 'Grandiflora'	19,4	30,9	49,1	58,2	67,2	68,1	65,3	45,7
Середнє	19,6	32,4	47,3	57,3	66,1	67,2	64,2	44,4

Визначено, що найвищий вихід життєздатних стерильних експлантів отримано при введенні їх у культуру *in vitro* у період з 05 по 25 липня. Середня кількість життєздатних експлантів у цей період коливалася у межах 65,1–67,2 %, залежно від генотипу. Саме тому вказаний термін введення експлантів є найкращим для досліджених видів роду *Hydrangea*.

Розвиток меристем, експресія або пригнічення тотипотентності значною мірою залежали від умов, у які експланти потрапляли в культуру *in vitro*. Важливе значення мали освітлення, температурний режим і вологість. Кращі результати отримано за висаджування стерилізованого рослинного матеріалу на живильне середовище і культивування за температури повітря $25 \pm 1^\circ\text{C}$ та 16-ти годинного фотоперіоду з інтенсивністю освітлення 1–3 клк та відносної вологості 75 %.

стерилізації у 1,0 % нітраті срібла (AgNO_3) упродовж 2 хв. вихід стерильних експлантів становив 72,8 %, однак з них лише 20,5 % були життєздатними. Таким чином, встановлено, що найефективнішою речовиною для стерилізації при введенні мікропагонів з апікальною меристемою в ізолювану культуру є 0,1 % водний розчин дихлориду ртуті за експозиції 1,5–2,0 хвилин.

Отримані результати узгоджуються з попередньо отриманими результатами досліджень Sisko [20], у яких за стерилізації на основі NaOCl життєздатність експлантів була найнижчою.

На початковому етапі введення рослинного матеріалу в культуру велике значення має отримання неінфікованого життєздатного вихідного матеріалу. На отримання такого матеріалу впливають терміни відбирання та введення в культуру експлантів, а також середовище й умови пророщування.

Строки відбору експлантів та їх введення в культуру впливають на успішність мікроклонального розмноження, що пов'язано з їх онтогенетичним станом і часом введення в культуру. Пагони для введення в культуру *in vitro* відбирали навесні – в травні та влітку – у фазі цвітіння.

З'ясовано, що строки відбору та введення в культуру *in vitro* експлантів впливали на їх життєздатність (табл. 2). Виявлено, що живці усіх видів і сортів роду *Hydrangea*, відібрані та введені в культуру *in vitro* навесні, були менш заражені, але кількість стерильних життєздатних експлантів була значно меншою і становила від 19,4 до 20,6 %, порівняно з живцями відібраними і введенними в культуру влітку, що зумовлено фізіологічним їх станом та впливом хімічних реагентів.

Висновки

Визначено, що за стерилізації експлантів найбільшу кількість стерильних мікропагонів одержано при використанні 0,1 % розчину дихлориду ртуті (HgCl_2) за експозиції 1–1,5 хв. З 67,2–85,5 % отриманих стерильних експлантів життєздатними були 62,8–73,3 %. Збільшення часу стерилізації HgCl_2 до 2,0 хв. призвело до зниження на 8,1–18,6 % життєздатності експлантів. Найнижчою була ефективність стерилізації при використанні розчину 2,5 % гіпохлориту натрію (NaOCl) за всіх експозицій. Збільшення тривалості стерилізації від 1,0 до 2,0 хвилин сприяло збільшенню кількості стерильних експлантів з 0,5 до 55,8 %, однак їхня життєздатність була низькою та не перевищувала 43,4 %. За стерилізації експлантів у розчині 1,0 % нітрату срібла (AgNO_3) отримано більшу кількість стерильних

експлантів, ніж за стерилізації у розчині гіпохлориту натрію, однак їхня життєздатність була найнижчою і коливалася в межах 20,5–31,2 %, залежно від експозиції.

З'ясовано, що строки відбору та введення в культуру *in vitro* впливали на життєздатність експлантів. Живці усіх видів і сортів гортензії, відібрані та введені у культуру *in vitro* навесні, були менш заражені, однак середня кількість життєздатних експлантів була значно меншою, порівняно з живцями, відібраними і внесеними в культуру влітку, і становила 19,4–20,6 %.

Перспективи подальших досліджень передбачають підбір складу живильного середовища для підвищення ефективності клонального мікророзмноження видів роду *Hydrangea* L.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Не застосовується.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автор стверджує про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання ШІ та технологій на основі ШІ

Автор заявляє, що не використовував штучний інтелект або технології на основі ШІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. Rybalchenko, A. M., & Kryvoruchko, L. M. (2024). Microclonal reproduction in *in vitro* culture: Possibilities and advantages of use. *Ukrainian Journal of Natural Sciences*, 10, 150–157. <https://doi.org/10.32782/naturaljournal.10.2024.14>
2. Khan, Z., Akram, A., Irfan, M., & Khan, K. (2025). Cloning of plant cells: Different methods of cloning and its applications – Advantages and disadvantages of plant cell cloning. In D. Singh, D. N. Chauhan, N. S. Chauhan, & M. Singh (Eds.), *Plant biotechnology: The medicinal and phytopharmaceutical aspects* (1st ed., pp. 103–119). CRC Press.
3. Vinoth, A., & Ravindhran, R. (2013). *In vitro* propagation – A potential method for plant conservation. *International Journal of Computer Algorithm*, 2, 268–272.
4. Mehbub, H., Akter, A., Akter, M. S. H., Mandal, M. S. H., Hoque, Md. A., Tuleja, M., & Mehraj, H. (2022). Tissue culture in ornamentals: Cultivation factors, propagation techniques, and its application. *Plants*, 11 (23), 3208. <https://doi.org/10.3390/plants11233208>
5. Kumar, M., Sirohi, U., Malik, S., Kumar, S., Ahirwar, G. K., Chaudhary, V., Yadav, M. K., Singh, J., Kumar, A., Pal, V., & Prakash, S. (2022). Methods and factors influencing *in vitro* propagation efficiency of ornamental tuberose (*Polianthes Species*): A systematic review of recent developments and future prospects. *Horticulturae*, 8(11), 998. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8110998>

6. Chornobrov, O. Yu., & Tkachova, O. E. (2021). Optimization of explants *in vitro* sterilization protocol of some deciduous tree species. *Ukrainian Journal of Forest and Wood Science*, 12(3), 80. <https://doi.org/10.31548/forest2021.03.007>
7. Gautam, N., Faroda, P., Agarwal, T., Harish, & Gupta, A. K. (2024). Effect of microclimatic physical factors on *in vitro* morphogenesis of plants: a systematic review. *Discover Agriculture*, 2(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s44279-024-00022-5>
8. Mosoh, D. A., Khandel, A. K., Verma, S. K., & Vendrame, W. A. (2023). Effects of sterilization methods and plant growth regulators on *in vitro* regeneration and tuberization in *Gloriosa superba* (L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 59(6), 792–807. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10387-9>
9. Krens, F. A., & Jamar, D. (1989). The role of explant source and culture conditions on callus induction and shoot regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Plant Physiology*, 134(6), 651–655. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(89\)80022-7](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(89)80022-7)
10. Mosoh, D. A., Khandel, A. K., Verma, S. K., & Vendrame, W. A. (2023). Effects of sterilization methods and plant growth regulators on *in vitro* regeneration and tuberization in *Gloriosa superba* (L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 59(6), 792–807. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10387-9>
11. Davoudpour, Y., Schmidt, M., Calabrese, F., Richnow, H. H., & Musat, N. (2020). High resolution microscopy to evaluate the efficiency of surface sterilization of Zea Mays seeds. *Plos One*, 15(11), e0242247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242247>
12. Sahu, P. K., Tilgam, J., Mishra, S., Hamid, S., Gupta, A. K., Verma, S. K., & Kharwar, R. N. (2022). Surface sterilization for isolation of endophytes: Ensuring what (not) to grow. *Journal of Basic Microbiology*, 62(6), 647–668. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100462>
13. Kiran, Garg, V., Dutt, R., Singh, M. R., Singh, D., & Singh, R. P. (2025). Sterilization methods and techniques involved in tissue culture, with protocols to sterilize different plant parts. In D. Singh, D. N. Chauhan, N. S. Chauhan, & M. Singh (Eds.), *Plant biotechnology: The medicinal and phytopharmaceutical aspects* (pp. 61–73). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003326939-7>
14. Permadi, N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A. N., Doni, F., & Julaehe, E. (2023). Managing Lethal Browning and Microbial Contamination in *Musa* spp. tissue culture: Synthesis and perspectives. *Horticulturae*, 9(4), 453. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040453>
15. Nagamani, J. E., Indu, B. K., Subbalakshmi, G., & Anuradha, M. (2025). Laboratory design and functionality. In M. Anuradha & S. Balasubramanya (Eds.), *In vitro production of plant secondary metabolites* (pp. 35–56). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-97-8808-8_3
16. Greer, S. P., & Rinehart, T. A. (2010). Dormancy and germination *in vitro* response of *Hydrangea macrophylla* and *Hydrangea paniculata* seed to light, cold-treatment and gibberellic acid. *Journal of Environmental Horticulture*, 28(1), 41–47. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-28.1.41>
17. Sacco, E., Savona, M., Antonetti, M., Grassotti, A., Pasqualetto, P. L., & Ruffoni, B. (2012). *In vitro* propagation and regeneration of several *Hydrangea* genotypes. *Acta Horticulturae*, 937, 565–572. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2012.937.68>
18. Onica, N., Nicolae, I. C., Roșca, I., Tabăra, M., Ciorchină, N., Glijin, A., & Venat, O. (2025). Genotype-dependent responses to sterilization and reesterilization in *in vitro* cultures of *Hydrangea macrophylla*. *AGROFOR International Journal*, 10(3), 48–56.
19. Zaripova, A. (2024). Obtaining aseptic *in vitro* culture of *Hydrangea paniculata* 'Samarskya Lydia'. *BIO Web of Conferences*, 121, 01008. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202412101008>
20. Šiško, M. (2016). *In vitro* tissue culture initiation from potted and garden *Hydrangea macrophylla* explants. *Agricultura*, 13(1-2), 65–69. <https://doi.org/10.1515/agricultura-2017-0008>

ORCID

M. Osipov 

<https://orcid.org/0000-0001-7004-1164>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

The effect of microfertilizer application on sunflower yield

O. Andreichenko✉

Article info

Correspondence Author

O. Andreichenko

E-mail:

andreichenko.olha@gmail.com

Central Ukrainian National
Technical University,
8, Prospekt Universytetskyi,
Kropyvnytskyi, 25006,
Ukraine

Citation: Andreichenko, O. (2026). The effect of microfertilizer application on sunflower yield. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 17–21. doi: 10.31210/spi2026.29.02.03

This article presents the findings of a scientific study investigated the effects of foliar micronutrient application on the biometric parameters, yield attributes, and overall productivity of the mid-early sunflower hybrid 'SY Barbati' during the 2024–2025 growing seasons. The relevance of the research is determined by the urgent need to identify effective agronomic practices aimed at mitigating the adverse impacts of prolonged droughts and temperature stresses in the Steppe zone of Ukraine. The objective of the study was to evaluate the impact of foliar micronutrient fertilization at various growth stages on sunflower performance. The experiment followed a two-factor design. Factor A represented the microfertilizer application stage: 1) 4-leaf stage, and 2) budding stage. Factor B included the microfertilizers used: 1) control (water), 2) Helprost Boron (2 L/ha), and 3) Helprost Universal (2 L/ha). Foliar application of the micronutrient fertilizers resulted in a 4.9–12.2 % increase in the number of leaves per plant. The maximum value of 19.8 leaves per plant was achieved when spraying with Helprost Universal at the 4-leaf stage. Treatment with Helprost Boron at the 4-leaf stage expanded the leaf assimilation surface area by 1,600 m²/ha, while Helprost Universal increased it by 3,200 m²/ha. Applying Helprost Boron at the 4-leaf stage increased head diameter by 1.6 cm and at the budding stage by 0.7 cm; meanwhile, Helprost Universal provided increases of 2.2 cm and 1.4 cm at the respective stages. The use of micronutrients enhanced the number of seeds per head by 115–198 at the 4-leaf stage and by 34–107 at the budding stage. The highest seed count was recorded with the foliar application of Helprost Universal (1,208 seeds per head at the 4-leaf stage). The 1,000-seed weight increased by 2.9–6.0 % depending on the specific product and application timing, reaching its maximum of 51.4 g in the treatment with Helprost Universal at the budding stage. Foliar microfertilization improved sunflower seed yield by 0.18–0.38 t/ha. The peak yield of 2.34 t/ha was obtained by treating the plants with Helprost Universal during the budding stage.

Keywords: sunflower, micronutrients, application stage, productivity, yield.

Вплив застосування мікродобрив на формування продуктивності соняшнику

О. Г. Андрейченко

Центральноукраїнський
національний технічний
університет,
м. Кропивницький, Україна

У статті висвітлено результати наукових досліджень щодо вивчення впливу позакореневого підживлення мікродобривами на біометричні параметри, елементи структури врожаю та загальну продуктивність середньораннього гібриду соняшнику СИ Барбаті протягом 2024–2025 рр. Актуальність роботи зумовлена необхідністю пошуку ефективних технологічних прийомів мінімізації наслідків тривалих посух та температурних стресів в умовах Степової зони України. Метою проведених досліджень було виявлення впливу позакореневого застосування мікродобрив у різні фази росту рослини на формування продуктивності соняшнику. Дослід закладався за двофакторною схемою. Фактор А (фаза внесення мікродобрив): 1) фаза 4 листків, 2) фаза бутонізації. Фактор В (мікродобрива): 1) контроль (вода), 2) Хелпрост Бор 2 л/га, 3) Хелпрост Універсальний 2 л/га. Позакореневе використання мікродобрив сприяло отриманню більшої кількості листків на рослині на 4,9–12,2 %. Кращий результат – 19,8 шт. листків на рослину встановлено при обприскуванні рослин у фазі 4 листків Хелпрост Універсальний. Обробка рослин у фазу 4 листків мікродобривом Хелпрост Бор сприяє збільшенню асиміляційної поверхні на 1,6 тис. м²/га, а Хелпрост Універсальний на 3,2 тис. м²/га. Застосування Хелпрост Бор у фазу 4 листків збільшує діаметр на 1,6 см та у фазу бутонізації на 0,7 см, а Хелпрост Універсальний у фазу 4 листків – на 2,2 см та у фазу бутонізації – 1,4 см. Використання мікродобрив збільшувало кількість насіння в кошику на 115–198 шт. у фазу 4 листків та на 34–107 шт. у фазу бутонізації. Найбільшу кількість насіння встановлено при позакореновому використанні мікродобрива Хелпрост Універсальний 1208 шт. (фаза 4 листків). Маса 1000 насінин збільшувалася на 2,9–6,0 % залежно від препарату на фази внесення. Найбільша маса 1000 насінин встановлено у варіанті використання мікродобрива Хелпрост Універсальний у фазу бутонізації і становив 51,4 г. Урожайність соняшнику збільшувалася при проведенні позакореневого обприскування мікродобривом на 0,18–0,38 т/га. Найбільшу урожайність отримано при обробці рослин мікродобривом Хелпрост Універсальний у фазу бутонізації і становила 2,34 т/га.

Ключові слова: соняшник, мікродобрива, фаза внесення, продуктивність, урожайність.



Бібліографічний опис для цитування: Андрейченко О. Г. Вплив застосування мікродобрив на формування продуктивності соняшнику. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 17–21.

Вступ

Соняшник залишається високорентабельною культурою, що зумовлює його високу концентрацію в сізовмінах. Але у зв'язку з посушливими кліматичними умовами під час його вирощування досягти високих врожаїв вкрай важко. Селекціонерами постійно ведеться робота з виведення гібридів, стійких до несприятливих умов [1, 2].

Традиційні системи удобрення, орієнтовані переважно на внесення макроелементів, часто виявляються недостатньо ефективними для повної реалізації генетичного потенціалу сучасних високопродуктивних гібридів. Внесення мікроелементів є головним етапом в технології вирощування соняшника, особливо таких, як бор, цинк, марганець та мідь, які відіграють роль каталізаторів ключових фізіолого-біохімічних процесів.

Науковці відзначають важливість застосування мікродобрив при вирощуванні соняшнику – це сприяє підвищенню ефективності поглинання рослинами з ґрунту поживних речовин мінеральних добрив та сприяє зростанню урожайності [3, 4].

Ефект від застосування мікродобрив прирівнюється до використання мінеральних добрив на 60–70 %, тоді як за спільного їх застосування ефективність самих мінеральних добрив сягає 86–96 % [5].

Важливу роль відіграє використання мікроелементів у підвищенні продуктивності культури. Так, наприклад, мікродобриво Торфовіт Хелат Комплекс у нормі 3,0 л/га забезпечив урожайність соняшнику на рівні 3,34 т/га [6].

Позакореневе підживлення соняшнику мікроелементами, яке проведене на фоні внесення азотних добрив, а також без попереднього використання макроелементів, сприяє покращенню біометричних показників, вмісту білка в насінні та площі листкової поверхні [7–9].

Виклики сьогодення вимагають пошуку заходів, що зможуть створити оптимальні умови для формування вищої продуктивності соняшнику. Такими заходами є застосування в агротехнологіях препаратів направлених на подолання втрат живлення та створення оптимальних умов для розвитку культури [10–12].

Отже, оптимізація доз, термінів та поєднань мікродобрив для конкретних умов залишається недостатньо вивченою. Наукове обґрунтування застосування інноваційних препаратів є актуальним завданням для підвищення стресостійкості, врожайності та стабілізації виробництва олійної сировини.

Мета дослідження

Метою проведених досліджень було виявлення впливу позакореневого застосування мікродобрив у різні фази росту рослини на формування продуктивності соняшнику.

Матеріали і методи

Дослідження проводилися у 2024–2025 рр. Дослід

закладався за двофакторною схемою. Фактор А (фаза внесення мікродобрив): 1) фаза 4 листків, 2) фаза бутонізації. Фактор В (мікродобрива): 1) контроль (вода), 2) Хелпрост Бор (2 л/га), 3) Хелпрост Універсальний (2 л/га). Ділянки розміщено послідовно у трьох повтореннях. Для проведення дослідження використовували гібрид соняшнику СИ Барбаті. Посухостійкий гібрид, який рекомендовано для вирощування в Степу України.

Ґрунт – чорнозем звичайний середньогумусний глибокий важкосуглинковий, із вмістом гумусу 3,8–4,2 %, реакція ґрунтового розчину близька до нейтральної.

Агрокліматичні умови в Кіровоградській області протягом 2024–2025 рр. суттєво обмежили реалізацію генетичного потенціалу соняшнику.

Весна 2024 р. була рання з гарним запасом ґрунтової вологи. У третій декаді квітня спостерігалися приморозки, що призводили до затримки отримання сходів та подекуди пошкоджували ранні посіви. З травня до вересня тривала посуха і температура перевищувала багаторічні показники на 4,8 °С, температура повітря іноді сягала до +38,8 °С. Дефіцит опадів у період росту і розвитку рослин становив 192,9 мм порівняно з середньобагаторічними даними. Критично високі температури та посуха спостерігалися у фазі цвітіння та наливу насіння, що призводило до стерилізації пилку та зниження маси 1000 насінин та, можливо, отриманої врожайності.

Погодні умови весни 2025 р. дозволили провести сівбу у оптимальні строки. Але у травні були відзначені зворотні приморозки. Літо виявилось посушливим, температура повітря перевищувала середньобагаторічні дані від 1,9 до 5,7 °С. Розподіл опадів був нерівномірним: червень – перевищення багаторічних показників у 2,3 раза, а у липні і серпні – недобір на 38,5 та 31 мм відповідно.

Результати та їх обговорення

На формування урожайності соняшнику мають вплив кліматичні умови, особливо в критичні періоди рослин, а також дефіцит необхідних елементів живлення. Для соняшнику одним із важливих елементів є бор. Він впливає на ріст пилкових трубок, проростання пилку, кількість квіток і плодів. Також він сприяє стійкості рослин до хвороб [13].

Посуха, яка спостерігалася під час вирощування соняшнику у 2024–2025 рр. призводила до зменшення кількості та площі листкового апарату соняшнику, але застосування мікродобрив уповільнювало відмирання нижнього ярусу листків.

Встановлено, що використання мікродобрива забезпечує отримання більшої кількості листків на рослині порівняно з контролем. Так, у контрольному варіанті кількість листків становила 17 та 18,2 шт., при позакореновому внесенні мікродобрив кількість листків збільшувалася на 4,9–12,2 %. Кращий результат – 19,8 шт. листків на рослину встановлено при обприскуванні рослин у фазі 4 листків Хелпрост Універсальний (*табл. 1*).

Таблиця 1

Біометричні показники соняшнику в фазі цвітіння залежно від мікродобрива (2024–2025 рр.)

Фаза внесення (фактор А)	Мікродобриво (фактор В)	Кількість листків на рослину, шт.	Площа листової поверхні тис. м ² /га
4 листків	контроль	18,2	42,2
	Хелпрост Бор (2 л/га)	19,1	43,8
	Хелпрост Універсальний (2 л/га)	19,8	45,4
Бутонізація	контроль	17,0	41,7
	Хелпрост Бор (2 л/га)	18,5	42,8
	Хелпрост Універсальний (2 л/га)	18,9	43,5

На урожайність рослин соняшнику впливає фотосинтез, діяльність якого залежить від площі асиміляційної поверхні. В результаті проведених досліджень науковцями була встановлена пряма залежність між площею листової поверхні та фоном живлення [14, 15]. Площа листової поверхні досягає максимуму на вершині росту та розвитку рослини [16].

Площа листової поверхні залежала від мікродобрива та фази внесення. В середньому за роки проведення дослідження соняшник СИ Барбаті у контрольному варіанті формував площу листової поверхні на рівні 41,7–42,2 тис. м²/га. Обробка рослин у фазі 4 листків мікродобривом Хелпрост Бор сприяє

збільшенню асиміляційної поверхні на 1,6 тис. м²/га, а Хелпрост Універсальний – на 3,2 тис. м²/га. Проведення обробки рослин у фазі бутонізації мікродобривами мало менший вплив на збільшення площі листової поверхні, і показник збільшувався порівняно з контролем на 1,1 тис. м²/га (Хелпрост Бор) та 1,8 тис. м²/га (Хелпрост Універсальний).

Також встановлено вплив мікродобрив на формування діаметра кошика залежно від фази рослини (*табл. 2*). Порівняно з контрольним варіантом застосування Хелпрост Бор у фазу 4 листків збільшує діаметр на 1,6 см та у фазу бутонізації на 0,7 см, а Хелпрост Універсальний у фазу 4 листків – на 2,2 см та у фазу бутонізації – на 1,4 см.

Таблиця 2

Діаметр кошика та кількість насінин у кошику соняшнику залежно від мікродобрив (2024–2025 рр.)

Фаза внесення (фактор А)	Мікродобриво (фактор В)	Діаметр кошика, см	Кількість насінин у кошику, шт.
4 листків	контроль	16,2	1010
	Хелпрост Бор (2 л/га)	17,8	1125
	Хелпрост Універсальний (2 л/га)	18,4	1208
Бутонізація	контроль	16,0	980
	Хелпрост Бор (2 л/га)	16,7	1014
	Хелпрост Універсальний (2 л/га)	17,4	1087

Проведення обробки рослин мікродобривами сприяло отриманню більшої кількості насінин у кошику. Приріст показника становив 115–198 шт. у фазу 4 листків та 34–107 шт. у фазу бутонізації. Найбільшу кількість насіння встановлено при поза-кореновому використанні мікродобрива Хелпрост Універсальний – 1208 шт. (фаза 4 листків).

Урожайність соняшнику залежить не лише від кількості сформованого насіння, а й від його

виповненості. Використання мікродобрив позитивно впливає на формування продуктивності рослин. Так, маса 1000 насінин збільшувалася на 2,9–6,0 % залежно від препарату на фазах внесення. Найбільша маса 1000 насінин встановлена у варіанті використання мікродобрива Хелпрост Універсальний у фазі бутонізації і становила 51,4 г (*табл. 3*).

Таблиця 3

Формування продуктивності соняшнику залежно від мікродобрив (2024–2025 рр.)

Фаза внесення (фактор А)	Мікродобриво (фактор В)	Маса 1000 насінин, г	Урожайність, т/га
4 листків	контроль	48,3	2,00
	Хелпрост Бор (2 л/га)	49,7	2,18
	Хелпрост Універсальний (2 л/га)	50,3	2,28
Бутонізація	контроль	48,5	1,96
	Хелпрост Бор (2 л/га)	50,1	2,24
	Хелпрост Універсальний (2 л/га)	51,4	2,34

Науковими дослідженнями встановлено позитивний вплив позакоренового підживлення рослин мікродобривами на формування урожайності соняшнику [17–20].

Урожайність соняшнику в середньому за 2024–2025 рр. формувалася на рівні 1,96 та 2,00 т/га (контроль), а під впливом використаного мікродобрива зростала на 0,18–0,38 т/га. Використання

мікродобрів у фазі 4 листків підвищує рівень врожаю на 0,18–0,28 т/га, а у фазі бутонізації – на 0,28–0,38 т/га залежно від використаного препарату. Найбільшу урожайність отримано при позакореновому підживленні мікродобривом Хелпрост Універсальний у фазу бутонізації, і вона становила 2,34 т/га.

Висновки

Таким чином, використання мікродобрів сприяє підвищенню біометричних та індивідуальних показників продуктивності рослин соняшнику. Застосування мікродобрива Хелпрост Універсальний формувало більшу кількість листків на 8,8 %, площу асиміляційної поверхні – на 7,6 %, діаметр кошика – на 13,6 %, кількість насінин у кошику – на 19,6 %, масу 1000 насінин – на 6,0 %. Для формування найбільшої врожайності соняшнику СИ Барбаті ефективним виявилось мікродобриво Хелпрост Універсальний з внесенням у фазу бутонізації, приріст врожаю становив 0,38 т/га.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження планується спрямувати на вивчення використання нових мікродобрів та їхнього впливу на формування урожайності нових гібридів соняшнику в умовах Степу України.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Не застосовується.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автор стверджує про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання ІІІ та технологій на основі ІІІ

Автор заявляє, що не використовував штучний інтелект або технології на основі ІІІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. Buha, N. Iu. (2014). Stan ta problemy aharnoho sektora ekonomiky Ukrainy v suchasnykh umovakh [The state and problems of the agricultural sector of Ukraine's economy under modern conditions]. *Visnyk Aharnoi Nauky Prychornomoria*, 1(77), 64–70. (in Ukrainian)
2. Mustafa, W., Tariq, K., Zafar, H., Affan, Q., Rafiq, M., Khan, M., Ashraf, W., & Asghar, S. (2023). Combining ability analysis for various morphological traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2023(1), 183. <https://doi.org/10.54112/bcsrj.v2023i1.183>
3. Harbar, L., Lishchuk, U., Dovbash, N., & Knap, N. (2021). Fertiliser efficiency in the formation of sunflower productivity. *Plant and Soil Science*, 12(1), 28–38. <https://doi.org/10.31548/agr2021.01.0028>
4. Palamarchuk, V. (2020). Foliar nutrition in modern sunflower hybrid growing technologies. *Agrobiologiya*, 1(157), 137–144. <https://doi.org/10.33245/2310-9270-2020-157-1-137-144>
5. Holik, H. A. (2007). Mikrodobryva – yakisno novyi pidkhid u zhyvlenni roslyn [Microfertilizers – a qualitatively new approach in plant nutrition]. *Ahrovisnyk*, 2(14), 26–27. (in Ukrainian)
6. Kozachko, V. I., & Ivanchenko, O. M. (2024). Efficiency of application of micro fertilizers in sunflower crops. *Taurian Scientific Herald*, 1(136), 192–201. <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2024.136.1.23>
7. Jarecki, W. (2022). Effect of varying nitrogen and micronutrient fertilization on yield quantity and quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes. *Agronomy*, 12(10), 2352. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102352>
8. Amin, H., Habib, A., Asif, M., Hameed, M. U., Wassi, M., Manzoor, M., Abbas, G., Nazeer, S., & Sajjad, M. (2023). Effect of foliar application of boron, zinc and manganese on growth, yield and oil contents of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Asian Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 9(4), 86–94. <https://doi.org/10.9734/ajsspn/2023/v9i4194>
9. Maqbool, R., Alawadi, H. F. N., Khan, B. A., Nadeem, M. A. N., Mahmood, A., Javaid, M. M., Syed, A., Ahmad, W., Ali, B., & Abdullah. (2023). Exploring the effect of zinc and boron application on oil contents, protein contents, growth and yield of sunflower. *Semina: Ciências Agrárias*, 44(4), 1353–1374. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2023v44n4p1353>
10. Shakalii, S. M. (2017). Formuvannya vrozhaistosti ta yakosti nasinnia soniashnyku zalezno vid pozakorenevoho pidzhyvlennia [Formation of sunflower seed yield and quality depending on foliar feeding]. *Zernovi Kultury*, 1(1), 69–74. (in Ukrainian)
11. Ieremenko, O., & Kalitka, V. (2016). Productivity of sunflower hybrids (*Helianthus annuus* L.) under the effect of AKM plant growth regulator in the conditions of low moisture of southern Steppe of Ukraine. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 9(9), 59–64. <https://doi.org/10.9790/2380-0909015964>
12. Kalenska, S., Ryzhenko, A., Novytska, N., Garbar, L., Stolyarchuk, T., Kalenskyi, V., & Shytiy, O. (2020). Morphological features of plants and yield of sunflower hybrids cultivated in the northern part of the Forest-Steppe of Ukraine. *American Journal of Plant Sciences*, 11(8), 1331–1344. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.118095>
13. Biliuk, M. Yu., & Khomina, V. Ya. (2022). Biometric indicators and yield of sunflower hybrids of different maturity depending on fertilization with microfertilizers. *Taurian Scientific Herald*, 128, 17–21. <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2022.128.3>
14. Garbar, L. A., Dovbash, N. I., & Venger, V. V. (2022). Formation of leaf apparatus of sunflower hybrids and efficiency of its functioning under the influence of fertilizer. *Agrarian Innovations*, 13, 24–29. <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2022.13.3>
15. Gamayunova, V., & Kudrina, V. (2020). Formation of aboveground mass and sunflower yield under the influence of certain elements of cultivation technology. *Ukrainian Black Sea Region Agrarian Science*, 24(1), 50–57. [https://doi.org/10.31521/2313-092x/2020-1\(105\)-7](https://doi.org/10.31521/2313-092x/2020-1(105)-7)
16. Kalinov, A. A., & Rozhkov, A. A. (2024). Variability of leaf surface area of sunflower plants under the influence of pre-sowing treatment of seed and foliar nutrition. *Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Oilseed Crops NAAS*, 37, 87–101. <https://doi.org/10.36710/ioc-2024-37-09>
17. Klymenko, I. I. (2015). Vplyv rehuliatoriv rostu roslyn i mikrodobryva na urozhaistost nasinnia linii ta hibrydiv soniashnyku [Influence of plant growth regulators and microfertilizers on seed yields of sunflower lines and hybrids]. *Selektsiia i Nasinnytstvo*, 107, 183–188. (in Ukrainian)
18. Chernov, O. D., & Usatiuk, O. V. (2025). Sunflower plant growth under different scenarios of micronutrient application against the background of base nutrient supply. *Collected Works of Uman National University of Horticulture*, 1(107), 439–444. <https://doi.org/10.32782/2415-8240-2025-107-1-439-444>
19. Shevchenko, V. V., & Filonenko, S. V. (2023). Efektyvnist ta dotslinist pozakorenevoho vnesennia mikroelementiv na soniashnyku [Effectiveness and expediency of foliar application of micronutrients on sunflower]. In *Aktualni problemy suchasnoi nauky: Teoretychni ta praktychni doslidzhennia molodykh uchenykh: Materialy I vseukrainskoi naukovo-praktychnoi konferentsii* (pp. 29–31). PDAU. (in Ukrainian)

20. Kalambet, V. (2025). Formation of sunflower productivity (*Helianthus annuus* L.) depending on agrotechnical methods. *Scientific Progress & Innovations*, 28(2), 81–86.
<https://doi.org/10.31210/spi2025.28.02.13>

ORCID

O. Andreichenko 

<https://orcid.org/0009-0003-0651-0263>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Formation of sunflower yield depending on the preceding crop, fertilization background, and pre-sowing seed treatment

V. Hamaionova¹ | T. Baklanova² | L. Hyrlya¹

Article info

Correspondence Author

V. Hamaionova

E-mail:

gamaionova2301@gmail.com

¹ Mykolaiv National Agrarian University,
9, Georgiy Gongadze Str.,
Mykolaiv, 54008, Ukraine

² State Institution "Mykolaiv State Agricultural Research Station of the Institute of Climate-Smart Agriculture of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine",
17 Tsentralna Str., Polihon settlement, Mykolaiv Region, 57217, Ukraine

Citation: Hamaionova, V., Baklanova, T., & Hyrlya, L. (2026). Formation of sunflower yield depending on the preceding crop, fertilization background, and pre-sowing seed treatment. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 22–27. doi: 10.31210/spi2026.29.02.04

The study investigated the effects of crop rotation sequence, background mineral fertilization, and pre-sowing seed treatment with the biological preparation Mykofrend on the yield of sunflower (SY Chester hybrid) in the Southern Steppe of Ukraine. The research was conducted during 2023–2025 on southern chernozem at the Educational, Scientific and Practical Center of Mykolaiv National Agrarian University. The experiment followed a three-factorial design. Factor A was the crop rotation sequence: maize – winter wheat – sunflower; pea – winter wheat – sunflower; winter wheat – winter wheat – sunflower; or winter wheat – sunflower – sunflower. Factor B involved seed treatment with water or Mykofrend. Factor C included the fertilization background: control and N30P15K15. Yield accounting, phenological observations, and statistical data processing followed generally accepted methods. Weather conditions varied significantly: 2023 was the most favorable (257.4 mm of precipitation in spring and June), 2024 recorded 161.5 mm, and 2025 was the least favorable and arid (95.5 mm). The highest average sunflower seed yield was achieved in the pea – winter wheat – sunflower sequence. Under water seed treatment, it reached 2.31 t/ha without fertilizers and 2.57 t/ha with N30P15K15. Seed treatment with Mykofrend increased these values to 2.51 and 2.77 t/ha, respectively. In the maize – winter wheat – sunflower sequence, the yield ranged from 1.92 to 2.23 t/ha under water treatment and from 2.16 to 2.41 t/ha with Mykofrend. In the winter wheat – winter wheat – sunflower sequence, productivity levels also increased under optimized nutrition and biopreparation. The lowest seed productivity was recorded under repeated sunflower cultivation in the winter wheat – sunflower – sunflower sequence: 1.47–1.67 t/ha under water treatment and 1.60–1.82 t/ha with Mykofrend. The most favorable conditions for sunflower yield formation were provided by placing the crop after pea and winter wheat, combined with N30P15K15 application and Mykofrend seed treatment. Repeated cultivation of sunflower after sunflower reduced crop yield even with fertilizers and the biological preparation. The results confirm the feasibility of combining a rational choice of the preceding crop, mineral fertilization, and biological pre-sowing seed treatment to increase sunflower yield in the Southern Steppe of Ukraine.

Keywords: sunflower, crop rotation sequence, preceding crop, pre-sowing seed treatment, mineral fertilizers, weather conditions, yield.

Урожайність соняшнику залежно від попередника, удобрення та передпосівної обробки насіння

В. В. Гамаюнова¹ | Т. В. Бакланова² | Л. М. Гирля¹

¹ Миколаївський національний аграрний університет,
м. Миколаїв, Україна

² Державна установа «Миколаївська державна сільськогосподарська дослідна станція Інституту кліматично орієнтованого сільського господарства Національної академії аграрних наук України»,
с-ще Полігон, Миколаївська область, Україна

Вивчено вплив ланки сівозміни, фону мінерального удобрення та передпосівної обробки насіння біопрепаратом Мікофренд на формування врожайності соняшнику (гібрид СИ Честер) в умовах Південного Степу України. Дослідження проводили впродовж 2023–2025 рр. на чорноземі південному в навчально-науково-практичному центрі Миколаївського національного аграрного університету. Дослід був трифакторним. Фактор А – ланка сівозміни: кукурудза – пшениця озима – соняшник; горох – пшениця озима – соняшник; пшениця озима – пшениця озима – соняшник; пшениця озима – соняшник – соняшник. Фактор В – обробка насіння водою або Мікофрендом. Фактор С – фон удобрення: контроль та N30P15K15. Облік урожайності, фенологічні спостереження та статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за загальноприйнятими методиками. Погодні умови у роки досліджень істотно різнилися: найсприятливішим за вологозабезпеченням був 2023 рік (257,4 мм опадів за весну та червень), у 2024 році випало 161,5 мм, а найменш сприятливим виявився посушливий 2025 рік (95,5 мм). За результатами досліджень найвищу середню врожайність насіння соняшнику забезпечила ланка сівозміни горох – пшениця озима – соняшник. За обробки насіння водою вона становила 2,31 т/га без добрив і 2,57 т/га за внесення N30P15K15. Обробка насіння Мікофрендом підвищувала ці показники до 2,51 та 2,77 т/га відповідно. У ланці кукурудза – пшениця озима – соняшник урожайність коливалася в межах 1,92–2,23 т/га за обробки водою та 2,16–2,41 т/га Мікофрендом. У ланці пшениця озима – пшениця озима – соняшник рівні врожайності також зростали з внесенням добрив і застосуванням біопрепарату. Найнижчу продуктивність насіння сформовано за повторного розміщення соняшнику після соняшнику в ланці пшениця озима – соняшник – соняшник: 1,47–1,67 т/га за обробки водою та 1,60–1,82 т/га – Мікофрендом. Найсприятливіші умови для формування врожайності соняшнику забезпечувало розміщення культури після гороху та пшениці озимої у поєднанні з внесенням N30P15K15 і обробкою насіння Мікофрендом. Повторне вирощування соняшнику після соняшнику призводило до зниження врожайності культури навіть за застосування добрив і біопрепарату. Результати підтверджують доцільність поєднання раціонального добору попередника, внесення мінерального добрива та передпосівної обробки насіння біопрепаратом для підвищення врожайності соняшнику в умовах Південного Степу України.

Ключові слова: соняшник, ланка сівозміни, попередник, передпосівна обробка насіння, мінеральні добрива, погодні умови, урожайність.



Бібліографічний опис для цитування: Гамаюнова В. В., Бакланова Т. В., Гирля Л. М. Урожайність соняшнику залежно від попередника, удобрення та передпосівної обробки насіння. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 22–27.

Вступ

Соняшник є однією з основних і найбільш поширених олійних культур в Україні, однак його продуктивність істотно залежить від погодних умов, попередника, рівня мінерального живлення, фітосанітарного стану посівів і здатності рослин ефективно використовувати вологу та поживні речовини. В умовах Південного Степу України ці питання набувають особливого значення, оскільки дефіцит опадів, високі температури та часті й тривалі посушливі періоди обмежують реалізацію потенціалу культури. У зв'язку з цим удосконалення технології вирощування соняшнику має ґрунтуватися на раціональному доборі попередника, помірному мінеральному удобренні, застосуванні біопрепаратів і збереженні родючості ґрунту.

Важливу роль у формуванні врожайності соняшнику відіграє розміщення культури в сівозміні. Дослідження, проведені в Україні, підтверджують, що тривале або надмірно часте повернення соняшнику на одне й те саме поле погіршує фітосанітарний стан посівів, знижує целюлозолітичну активність ґрунту, сприяє накопиченню інфекційного навантаження та зменшує його продуктивність. Зокрема, Dehtiarova et al. [1] вивчали короткоротаційні сівозміни з різним насиченням соняшником і встановили, що структура сівозміни впливає на біологічну активність орного шару ґрунту, зокрема на інтенсивність розкладання целюлози. Це підтверджує необхідність обмеження частки соняшнику в сівозміні та добору попередників, які не погіршують ґрунтове середовище і не сприяють накопиченню специфічних патогенів [2–4].

На рівні агроландшафтів негативний вплив повторного вирощування соняшнику також підтверджено й дистанційними дослідженнями. Так, Kussul et al. [5] дали оцінку впливу моновищування соняшнику в Україні за даними супутникового моніторингу та обґрунтували, що велика частка цієї культури в сівозміні пов'язана зі змінами вегетаційних індексів і зниженням біофізичних показників рослинного покриву. На необхідність дотримання науково обґрунтованого чергування культур, особливо в регіонах з високим рівнем насичення сівозмін соняшником, звертають увагу й ін. дослідники [6–8].

Особливо небажаним є повторне розміщення соняшнику після соняшнику. Таке вирощування посилює конкуренцію за вологу, сприяє однобічному використанню поживних речовин, зростанню ризику розвитку хвороб, шкідників і зниженню загальної продуктивності посівів. У цьому контексті наші результати, за яких найнижча врожайність формувалася в ланці сівозміни пшениця озима – соняшник – соняшник, логічно узгоджуються з даними багатьох науковців про негативний вплив повторного вирощування культури. Натомість розміщення соняшнику після гороху і пшениці озимої створює кращі умови для росту рослин, оскільки зернобобові культури сприяють поліпшенню азотного режиму ґрунту, а пшениця озима залишає після себе більш сприятливий фітосанітарний фон.

Не менш важливим чинником є система удобрення. Соняшник має високу потребу в елементах живлення, однак ефективність мінеральних добрив залежить від запасів продуктивної вологи та здатності кореневої системи засвоювати поживні речовини з ґрунту. Зокрема, Jarecki [9] встановив, що азотне та мікроелементне живлення впливають на врожайність, біометричні показники, якість сім'янок, індекс листової поверхні та показники SPAD у рослин соняшнику. Водночас встановлено, що ефективність удобрення змінювалася залежно від погодних умов року, які особливо часто проявляються в зонах нестійкого зволоження.

Soêlho et al. [10] зазначають, що ефективність використання азоту соняшником значною мірою залежить від генотипу та дози добрив. У їхньому дослідженні різні сорти і гібриди неоднаково реагували на азотне живлення, що свідчить про необхідність поєднання системи удобрення з біологічними особливостями конкретного гібриду. Це має практичне значення і для отриманих нами даних, оскільки навіть за однакового фону живлення реакція культури змінюється залежно від попередника, передпосівної обробки насіння та погодних умов року.

Позакореневе та мікроелементне живлення також розглядають як важливий захід для проходження продукційного процесу рослин соняшнику за несприятливих умов. Так, Crista et al. [11] дослідили вплив комплексного позакореневого удобрення на врожайність і якість насіння соняшнику та встановили, що такі підходи можуть істотно змінювати рівні врожайності та хімічний склад насіння. Особливо важливим у вирощуванні соняшнику є забезпечення рослин бором, цинком, марганцем, міддю та іншими мікроелементами у періоди інтенсивного росту, цвітіння й формування насіння, на що вказує низка дослідників [12–14].

В умовах Південного Степу України важливим доповненням до мінерального живлення є застосування біопрепаратів для підживлення та передпосівної обробки насіння. Біологічні препарати покращують початковий ріст рослин, активізують розвиток кореневої системи, сприяють кращому засвоєнню поживних речовин і посилюють стійкість рослин до стресових умов. У наших дослідженнях передпосівна обробка насіння Мікофрендом також забезпечувала підвищення врожайності в усіх ланках сівозміни, що свідчить про позитивну дію біопрепарату на формування продуктивності соняшнику.

Окремий важливий напрям сучасних досліджень доцільно пов'язувати з використанням рослинних решток попередників і біодеструкторів. В. Гамаюною та В. Павловим встановлено, що застосування біодеструкторів сприяє прискоренню розкладання рослинних решток, активізації мікробіологічних процесів і поліпшенню показників родючості ґрунту. Для соняшнику, який висівали після пшениці озимої, це має важливе значення, оскільки культуру часто вирощують за дефіциту вологи, що потребує підтримання сприятливого поживного та водного режимів ґрунту [15, 16]. Дослідженнями щодо ефективності біодеструкторів у технології вирощування соняшнику із заробком в ґрунт залишків попередника в умовах

Південного Степу України встановлено їхній позитивний вплив на ґрунтове середовище, зокрема на спроможність накопичувати й утримувати вологу. Застосування біологічних препаратів сприяє збільшенню вмісту мінеральних форм азоту, поліпшенню доступності поживних речовин і створенню кращих умов для росту рослин. Це дає підстави розглядати біодеструктори як складову технології, що доповнює мінеральне удобрення та передпосівну обробку насіння.

Значення біологічних і ресурсозберігаючих підходів у технології вирощування соняшнику посилюється в умовах кліматичних змін. Debaeke et al. [17] зазначають, що соняшник завдяки пластичності та порівняно помірній потребі у воді, азоті й засобах захисту рослин може бути важливою культурою для екологічно орієнтованих систем землеробства. Водночас автори вказують на потребу в добір нових типів рослин, здатних поєднувати продуктивність, стійкість до абіотичних стресів і ефективне використання ресурсів.

Мета дослідження

Метою досліджень було встановити вплив ланки сівозміни, фону мінерального удобрення та передпосівної обробки насіння біопрепаратом Мікофренд на формування врожайності соняшнику в роки вирощування.

Матеріали і методи

Експериментальні дослідження з вивчення впливу попередників, фону удобрення та передпосівної обробки насіння на врожайність соняшнику проводили в умовах ННПЦ МНАУ. Польовий дослід заклали на чорноземі південному, який є типовим для зони проведення досліджень. Вміст гумусу в орному шарі ґрунту складає 2,9–3,1 %, забезпеченість його доступними формами азоту – середня, а рухомих фосфором і обмінним калієм – підвищена. У досліді вирощували ранньостиглий гібрид соняшнику СИ Честер, рекомендований для умов Степу України та придатний для вирощування за ресурсощадною технологією. Агротехніка вирощування соняшнику, за винятком факторів, поставлених на вивчення, була загальноприйнятою для степової зони.

Схемою досліді передбачалося вивчення трьох факторів.

Фактор А – ланка сівозміни:

1. кукурудза – пшениця озима – соняшник;
2. горох – пшениця озима – соняшник;
3. пшениця озима – пшениця озима – соняшник;
4. пшениця озима – соняшник – соняшник.

Фактор В – передпосівна обробка насіння:

1. обробка насіння водою;
2. обробка насіння біопрепаратом Мікофренд.

Фактор С – фон удобрення:

1. без добрив – контроль;
2. внесення мінерального добрива $N_{30}P_{15}K_{15}$.

Передпосівну обробку насіння проводили безпосередньо перед сівбою відповідно до схеми досліді. У контрольному варіанті насіння обробляли

водою, у дослідному – біопрепаратом Мікофренд (1 л/т насіння). Мінеральні добрива у нормі $N_{30}P_{15}K_{15}$ вносили згідно зі схемою досліді під передпосівний обробіток ґрунту.

Соняшник висівали у строки, рекомендовані для умов Південного Степу України, за настання оптимальної температури ґрунту для проростання насіння. Догляд за посівами включав заходи, спрямовані на збереження ґрунтової вологи, контроль бур'янів, підтримання належного фітосанітарного стану та створення сприятливих умов для росту й розвитку рослин.

Упродовж вегетаційного періоду проводили фенологічні спостереження за ростом і розвитком рослин соняшнику, оцінювали стан посівів, вплив погодних умов у досліджуваних роках і реакцію культури на досліджувані фактори. Особливу увагу приділяли впливу попередників на умови формування врожаю, оскільки різні ланки сівозміни по-різному впливають на водний режим ґрунту, поживний фон, фітосанітарний стан поля та загальну продуктивність культури.

Збирання врожаю проводили у фазі повної стиглості соняшнику з облікової площі кожної ділянки. Урожайність насіння визначали в перерахунку на стандартну вологість і виражали в т/га. Облік урожаю, спостереження, відбір зразків та статистичну обробку експериментальних даних здійснювали відповідно до загальноприйнятих методик польового досліді [18–20].

Одержані результати аналізували за роками досліджень та, в середньому, за 2023–2025 рр. Дію кожного фактора оцінювали як окремо, так і в поєднанні з впливом на врожайність соняшнику. Для визначення достовірності різниць між варіантами використовували дисперсійний аналіз із розрахунком HP_{05} за факторами А, В, С та їх взаємодіями.

Такий підхід дав змогу встановити ефективність розміщення соняшнику після різних попередників, доцільність застосування помірного мінерального удобрення $N_{30}P_{15}K_{15}$ та передпосівної обробки насіння Мікофрендом для підвищення врожайності культури в умовах Південного Степу України.

Результати та їх обговорення

У роки проведення досліджень погодні умови істотно різнилися, насамперед за кількістю атмосферних опадів та їх розподілом упродовж вегетаційного періоду. Найбільш сприятливим за рівнем вологозабезпечення був 2023 рік. У березні випало 95,6 мм опадів, у квітні – 70,0 мм, у травні – 19,2 мм, у червні – 72,6 мм. Загальна сума опадів за весняний період і червень становила 257,4 мм, що забезпечило достатнє зволоження ґрунту як на період сівби, так і в основні фази росту та розвитку рослин соняшнику.

У 2024 році забезпеченість вологою також була відносно достатньою, хоча розподіл опадів був менш рівномірним. У березні випало 47,4 мм, у квітні – 26,9 мм, у травні – 82,8 мм, у червні – лише 4,4 мм. Сума атмосферних опадів за цей період склала 161,5 мм. Незважаючи на істотне зменшення кількості опадів у червні, їх надходження у попередні місяці сприяло формуванню певних запасів продуктивної вологи в ґрунті.

Найменш сприятливим для вирощування соняшнику виявився 2025 рік, який характеризувався вираженим дефіцитом вологи. У березні випало 22,1 мм опадів, у квітні – 50,6 мм, у травні – 18,4 мм, у червні – 4,4 мм. Загальна сума опадів за весняний період і червень становила лише 95,5 мм, що було у 2,6 рази менше порівняно з 2023 роком і в 1,7 рази менше ніж у 2024 році. Таке обмежене вологозабезпечення негативно позначилося на ростових процесах, формуванні генеративних органів, рівні врожайності насіння та його якості.

Узагальнення результатів досліджень і наукових джерел свідчить, що ефективність технології вирощування соняшнику визначається не одним окремим агрозаходом, а поєднанням взаємопов'язаних рішень: правильним добором попередника, підтриманням оптимального поживного режиму, застосуванням біопрепаратів для передпосівної обробки насіння,

використанням рослинних решток попередників і заходами збереження родючості ґрунту.

Отримані нами результати підтверджують цю закономірність. Найвищу врожайність соняшнику одержано за вирощування його в ланці сівозміни горох – пшениця озима – соняшник по фоні внесення $N_{30}P_{15}K_{15}$ та проведення передпосівної обробки насіння Мікофрендом. Це свідчить, що продуктивність соняшнику в умовах Південного Степу України формується під впливом сумісної дії попередника, фону живлення, біологічної підтримки рослин і погодних умов року вирощування.

Найвищу врожайність соняшнику отримано в ланці сівозміни горох – пшениця озима – соняшник. За обробки насіння водою врожайність становила 2,31 т/га без добрив і 2,57 т/га по фоні $N_{30}P_{15}K_{15}$ (рис. 1). Передпосівна обробка насіння Мікофрендом підвищувала ці показники до 2,51 та 2,77 т/га відповідно.

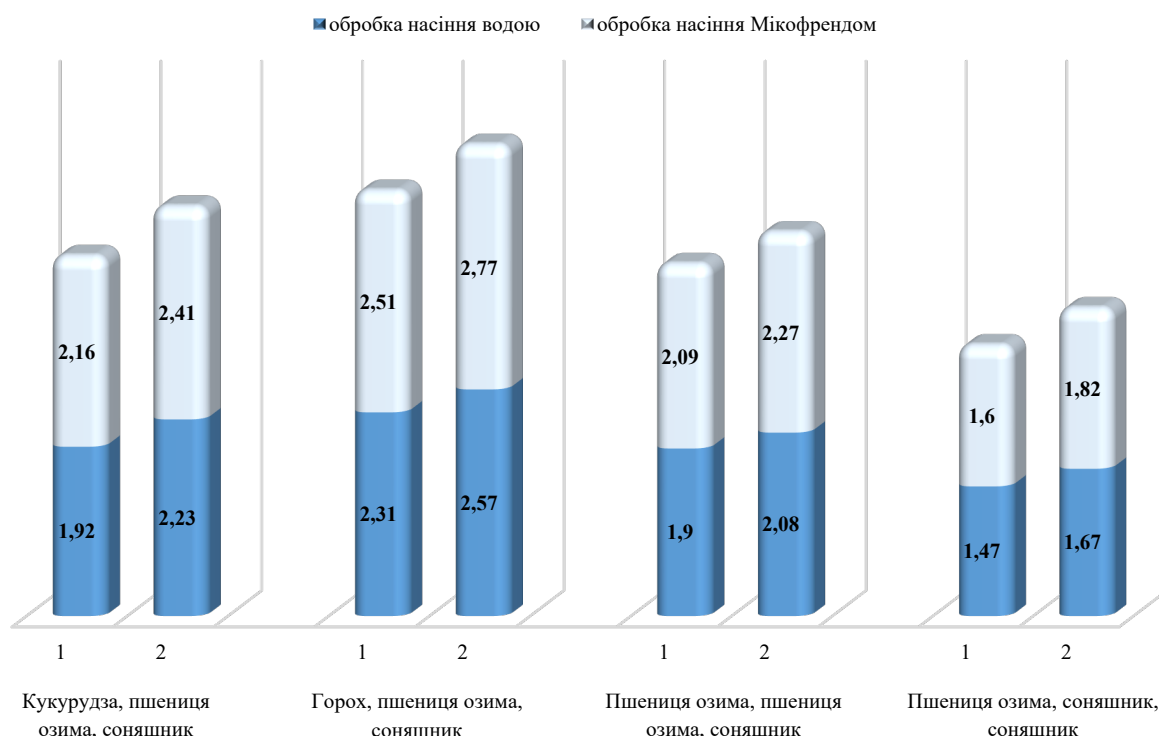


Рис. 1. Вплив попередника, оптимізації живлення і передпосівної обробки насіння на врожайність соняшнику (середнє за 2023–2025 рр.), т/га

Примітки: 1 – без добрив (контроль); 2 – $N_{30}P_{15}K_{15}$

У ланці кукурудза – пшениця озима – соняшник урожайність була нижчою: за обробки насіння водою вона становила 1,92–2,23 т/га, а за обробки Мікофрендом – 2,16–2,41 т/га залежно від фонів живлення. За вирощування у ланці сівозміни пшениця озима – пшениця озима – соняшник рівні врожайності склали відповідно 1,90–2,08 т/га за передпосівної обробки насіння водою та 2,09–2,27 т/га Мікофрендом.

Найнижчу врожайність насіння сформовано за повторного розміщення соняшнику після соняшнику в ланці сівозміни пшениця озима – соняшник – соняшник. У цьому варіанті за обробки насіння водою врожайність становила 1,47 т/га без добрив і 1,67 т/га по фоні внесення $N_{30}P_{15}K_{15}$. За передпосівної обробки

насіння Мікофрендом вона зросла до 1,60 і 1,82 т/га відповідно.

Отримані дані свідчать, що найбільш оптимальні умови для формування врожайності соняшнику забезпечувало розміщення культури після гороху та пшениці озимої у поєднанні з внесенням $N_{30}P_{15}K_{15}$ і передпосівною обробкою насіння Мікофрендом. Повторне вирощування соняшнику після соняшнику істотно знижувало продуктивність культури навіть за застосування добрив і біопрепарату.

Продуктивність культури істотно змінювалася під впливом попередників, мінерального живлення, обробки насіння Мікофрендом та кліматичних умов року (табл. 1).

Таблиця 1

Урожайність соняшнику залежно від ланки сівозміни, фону удобрення і передпосівної обробки насіння у роки вирощування, т/га

Ланка сівозміни (фактор А)	Фон удобрення (Фактор С)	Обробка насіння водою (фактор В)				Обробка насіння Мікофрендом (фактор В)			
		2023	2024	2025	2023–2025	2023	2024	2025	2023–2025
Кукурудза, пшениця озима, соняшник	без добрив (контроль)	2,43	2,05	1,29	1,92	2,74	2,30	1,44	2,16
	N ₃₀ P ₁₅ K ₁₅	2,86	2,40	1,43	2,23	3,09	2,59	1,54	2,41
Горох, пшениця озима, соняшник	без добрив (контроль)	2,91	2,44	1,57	2,31	3,17	2,66	1,71	2,51
	N ₃₀ P ₁₅ K ₁₅	3,11	2,87	1,72	2,57	3,35	3,10	1,86	2,77
Пшениця озима, пшениця озима, соняшник	без добрив (контроль)	2,30	1,90	1,51	1,90	2,53	2,08	1,66	2,09
	N ₃₀ P ₁₅ K ₁₅	2,48	2,10	1,66	2,08	2,70	2,29	1,83	2,27
Пшениця озима, соняшник, соняшник	без добрив (контроль)	1,84	1,65	0,91	1,47	1,99	1,80	1,01	1,60
	N ₃₀ P ₁₅ K ₁₅	2,07	1,92	1,02	1,67	2,24	2,09	1,12	1,82
НІР ₀₅	Фактор А	0,11	0,09	0,08					
	Фактор В	0,08	0,07	0,06					
	Фактор С	0,13	0,11	0,09					
	Фактор АВ	0,13	0,12	0,10					
	Фактор АС	0,15	0,13	0,11					
	Фактор ВС	0,12	0,10	0,08					
	Фактор АВС	0,14	0,11	0,11					

Найнижча врожайність насіння формувалася за повторного розміщення соняшнику після соняшнику в ланці сівозміни пшениця озима – соняшник – соняшник. За обробки насіння водою та без внесення добрив середня врожайність за 2023–2025 рр. склала лише 1,47 т/га, а за внесення N₃₀P₁₅K₁₅ зросла до 1,67 т/га. Передпосівна обробка насіння Мікофрендом підвищила її відповідно до 1,60 і 1,82 т/га, що свідчить про позитивний вплив біопрепарату навіть за розміщення культури в сівозміні по менш сприятливому попереднику.

Найвищу врожайність насіння соняшнику отримано в ланці горох – пшениця озима – соняшник. У цьому варіанті за обробки насіння водою та без добрив середня врожайність склала 2,31 т/га, а по фоні внесення N₃₀P₁₅K₁₅ – 2,57 т/га. За передпосівної обробки насіння Мікофрендом урожайність зростала до 2,51 т/га на неудобреному фоні та до 2,77 т/га за внесення мінеральних добрив. Це свідчить про створення кращих умов для формування продуктивності соняшнику за включення гороху до складу ланки сівозміни.

Ланка сівозміни кукурудза – пшениця озима – соняшник забезпечила середню врожайність за обробки насіння водою, яка становила 1,92 т/га без добрив і 2,23 т/га за внесення N₃₀P₁₅K₁₅. За обробки насіння Мікофрендом її рівні зросли до 2,16 та 2,41 т/га відповідно. Подібну закономірність спостерігали і в ланці пшениця озима – пшениця озима – соняшник, де застосування добрив та Мікофренду також призводило до приросту врожайності.

У всі роки досліджень передпосівна обробка насіння Мікофрендом забезпечувала вищі показники врожайності порівняно з обробкою водою. Найбільші абсолютні значення врожайності насіння визначено у 2023 році, тоді як у 2025 році продуктивність культури була найнижчою в усіх варіантах дослідів, що зумовлено менш сприятливими погодними умовами.

Внесення мінерального добрива N₃₀P₁₅K₁₅ підвищувало врожайність насіння соняшнику в усіх ланках сівозміни. Максимальний результат забезпечило поєднання ланки горох – пшениця озима – соняшник,

внесення N₃₀P₁₅K₁₅ та проведення передпосівної обробки насіння Мікофрендом, де середня врожайність за 2023–2025 рр. склала 2,77 т/га.

Висновки

Проведеними дослідженнями встановлено, що врожайність соняшнику в умовах Південного Степу України значною мірою залежала від ланки сівозміни, фону мінерального удобрення та передпосівної обробки насіння. Найсприятливіші умови для формування продуктивності культури забезпечувало розміщення соняшнику після гороху та пшениці озимої. У цій ланці сівозміни сформовано найвищу за роки досліджень середню врожайність насіння – 2,77 т/га за внесення N₃₀P₁₅K₁₅ та проведення передпосівної обробки насіння Мікофрендом. Застосування мінерального удобрення підвищувало врожайність соняшнику в усіх досліджуваних ланках сівозміни. Передпосівна обробка насіння Мікофрендом також сприяла зростанню насінневої продуктивності культури порівняно з обробкою водою. Мінімальна врожайність формувалася за повторного розміщення соняшнику після соняшнику в ланці сівозміни пшениця озима – соняшник – соняшник. Повторне вирощування соняшнику знижувало продуктивність культури навіть за застосування добрив і біопрепарату. Отримані результати підтверджують доцільність поєднання раціонального добору попередника, помірного мінерального удобрення та передпосівної обробки насіння біологічним препаратом (Мікофрендом) для підвищення врожайності соняшнику за вирощування його в посушливих умовах Південного Степу України.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з необхідністю вивчення ефективності попередників, фону удобрення та передпосівної обробки насіння біологічним препаратом для нових гібридів соняшнику, які постійно оновлюються у виробництві та відрізняються за тривалістю вегетаційного періоду, посухостійкістю, стійкістю до хвороб і реакцією на рівень мінерального живлення.

Особливої уваги потребує оцінка цих технологічних заходів за різних погодних умов років вирощування, оскільки посилення посушливості, нерівномірний розподіл опадів і високі температури істотно змінюють умови формування врожайності насіння соняшнику. Подальші дослідження доцільно спрямувати на визначення найбільш ефективних поєднань гібрида, попередника, мінерального живлення та біопрепаратів для забезпечення сталої продуктивності й екологічного виробництва культури в умовах Південного Степу України.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Не застосовується.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання ШІ та технологій на основі ШІ

Автори заявляють, що не використовували штучний інтелект або технології на основі ШІ під час підготовки цього рукопису.

References

- Dehtiarova, Z. (2022). The effect of short-term crop rotation with different proportions of sunflower on cellulolytic activity of the soil. *Soil Science Annual*, 73(4), 1–8. <https://doi.org/10.37501/soilsa/156097>
- Zani, C. F., Manning, D. A. C., Abbott, G. D., Taylor, J. A., Cooper, J., & Lopez-Capel, E. (2023). Diversified crop rotations and organic amendments as strategies for increasing soil carbon storage and stabilisation in UK arable systems. *Frontiers in Environmental Science*, 11, 1113026. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1113026>
- Liu, Q., Zhao, Y., Li, T., Chen, L., Chen, Y., & Sui, P. (2023). Changes in soil microbial biomass, diversity, and activity with crop rotation in cropping systems: A global synthesis. *Applied Soil Ecology*, 186, 104815. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.104815>
- Li, M., Guo, J., Ren, T., Luo, G., Shen, Q., Lu, J., Guo, S., & Ling, N. (2021). Crop rotation history constrains soil biodiversity and multifunctionality relationships. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 319, 107550. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107550>
- Kussul, N., Deininger, K., Shumilo, L., Lavreniuk, M., Ali, D. A., & Nivievskiy, O. (2022). Biophysical impact of sunflower crop rotation on agricultural fields. *Sustainability*, 14(7), 3965. <https://doi.org/10.3390/su14073965>
- Syromiatnykov, Y., Ishniyazova, S., Troyanovskaya, I., Voinash, S., Garkin, I., Malikov, V., & Orekhovskaya, A. (2026). optimizing crop rotation and cereal saturation for sustainable winter wheat production under semiarid conditions of Uzbekistan. *Advances in Agriculture*, 2026(1), 5863850. <https://doi.org/10.1155/aia/5863850>
- Dehtiarova, Z., Shevchenko, M., Dehtiarov, Y., & Budyonny, V. (2024). The efficiency of short-term crop rotations with different sunflower saturation. *Scientific Horizons*, 27(12), 47–55. <https://doi.org/10.48077/scihor12.2024.47>

- Al-Musawi, Z. Kh., Vona, V., & Kulmány, I. M. (2025). Utilizing different crop rotation systems for agricultural and environmental sustainability: A review. *Agronomy*, 15(8), 1966. <https://doi.org/10.3390/agronomy15081966>
- Jarecki, W. (2022). Effect of varying nitrogen and micronutrient fertilization on yield quantity and quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes. *Agronomy*, 12(10), 2352. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102352>
- Coelho, E. d. S., Souza, A. R. E. d., Lins, H. A., Santos, M. G. d., Freitas Souza, M. d., Tartaglia, F. d. L., de Oliveira, A. K. S., Lopes, W. d. A. R., Silveira, L. M., Mendonça, V., & Barros Júnior, A. P. (2022). Efficiency of nitrogen use in sunflower. *Plants*, 11(18), 2390. <https://doi.org/10.3390/plants11182390>
- Crista, F., Radulov, I., Imbrea, F., Manea, D. N., Boldea, M., Gergen, I., Ienciu, A. A., & Bănăţean Dunea, I. (2023). The study of the impact of complex foliar fertilization on the yield and quality of sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) by principal component analysis. *Agronomy*, 13(8), 2074. <https://doi.org/10.3390/agronomy13082074>
- Crista, F., Imbrea, F., Radulov, I., Crista, L., & Lato, A. (2024). Assessment of the effects of complex foliar fertilization on the yield and quality of sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.). *24th International Multidisciplinary Scientific GeoConference Proceedings SGEM 2024, Water Resources. Forest, Marine and Ocean Ecosystems*, 24(3.2), 203–212. <https://doi.org/10.5593/sgem2024v3.2/s12.27>
- Pruthviraj, N., Geetha, K. N., Chandrashekar, C. P., Raghu, A. V., Prasad, G., Ramarao, Gangana Gowdra, V. M., Nagangoudar, M. B., Harish, M. C., Karthik, A. N., Dhanush, G., Tilak, K., & Kotresh, D. J. (2025). Evaluation of the altered enzymatic and pollen activity in sunflower on application of nanoparticles. *Plant Physiology and Biochemistry*, 220, 109471. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.109471>
- Ali, S., Riaz, A., Mamtaz, S., & Haider, H. (2023). Nutrients and crop production. *Current Research in Agriculture and Farming*, 4(2), 1–15.
- Hamaiunova, V. V., & Pavlov, V. O. (2024). From stubble to healthy soil: the role of biodestructors in agriculture. *Agrarian Innovations*, 28, 32–37. <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2024.28.5>
- Gamayunova, V. V., & Pavlov, V. O. (2024). Total water consumption of sunflower under the influence of researched factors in the conditions of the Southern Steppe of Ukraine. *Taurian Scientific Herald*, 140, 88–95. <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2024.140.12>
- Debaeke, P., Casadebaig, P., & Langlade, N. B. (2021). New challenges for sunflower ideotyping in changing environments and more ecological cropping systems. *OCL*, 28, 29. <https://doi.org/10.1051/ocl/2021016>
- Ushkarenko, V. O., Vozhehova, R. A., Holoborodko, S. P., & Kokovikhin, S. V. (2014). *Metodyka polovoho doslidu: navchalnyi posibnyk* [Methodology of field experiment: a study guide]. Hrin D. S. (in Ukrainian)
- Rozhkov, A. O., Puzik, V. K., Kalenska, S. M., Puzik, L. M., Popov, S. I., Muzafarov, N. M., Bukhalo, V. Ya., & Kryshopt, Ye. A. (2016). *Doslidna sprava v ahronomii: navchalnyi posibnyk: u 2 kn. Kn. 1. Teoretychni aspekty doslidnoi spravy* [Research in agronomy: a textbook: in 2 books. Book 1. Theoretical aspects of research] (A. O. Rozhkov, Ed.). Maidan (in Ukrainian)
- Rozhkov, A. O., Puzik, V. K., Kalenska, S. M., Puzik, L. M., Popov, S. I., Muzafarov, N. M., Bukhalo, V. Ya., & Kryshopt, Ye. A. (2016). *Doslidna sprava v ahronomii: navchalnyi posibnyk: u 2 kn. Kn. 2. Statystychna obrobka rezul'tativ ahronomichnykh doslidzhen* [Research in agronomy: a textbook: in 2 books. Book 2. Statistical processing of agronomic research results] (A. O. Rozhkov, Ed.). Maidan. (in Ukrainian)

ORCID

V. Hamaiunova 
T. Baklanova 
L. Hrylya 

<https://orcid.org/0000-0002-4151-0299>
<https://orcid.org/0000-0002-6699-2693>
<https://orcid.org/0000-0002-8964-4253>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Integrated assessment of the reproductive performance of ewes of different genetic origins considering animal welfare indicators

V. Sheiko✉

Article info

Correspondence Author
V. Sheiko
E-mail:
attis.ukraine@gmail.com

Odesa State Agrarian
University,
Panteleimonivs'ka Str., 13,
Odesa, 65012, Ukraine

Citation: Sheiko, V. (2026). Integrated assessment of the reproductive performance of ewes of different genetic origins considering animal welfare indicators. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 28–33. doi: 10.31210/spi2026.29.02.05

The article investigates the peculiarities of reproductive performance formation in ewes of different genetic origins under modern intensive sheep production systems. The relevance of the study is determined by the need to improve flock reproductive efficiency through the combination of genetic resources, the enhancement of breeding strategies, and the consideration of animal welfare indicators. It was established that genetic origin significantly affects fertility, prolificacy, and lamb output. Crossbred genotypes Dorper × Romanov and Merinoland × Romanov outperformed purebred Dorper sheep in most reproductive traits, demonstrating the manifestation of heterosis effects. The highest fertility rate (92.3 %) was recorded in the Dorper × Romanov group, whereas the greatest prolificacy (161.1 %) was observed in Merinoland × Romanov ewes. The results showed that crossbred animals were characterized by higher milk production (5.7–9.6 % increase), lower incidence of diseases and stress load, and better behavioral activity indicators, suggesting a higher level of animal welfare. At the same time, the highest lamb survival rate was observed in purebred Dorper ewes (90.9 %), whereas a slight decrease was recorded in crossbred groups due to their increased prolificacy. The Integrated Reproductive Ability Index (RAI) in the experimental groups ranged from 0.73 to 0.91 conventional units. The highest values were obtained in the Merinoland × Romanov group (+24.7 % compared with Dorper), indicating the most complete realization of genetic complementarity and an optimal balance between productivity and adaptability. The scientific novelty of the study lies in substantiating a systematic approach to evaluating reproductive performance based on the integration of genetic, productive, and animal welfare indicators. Therefore, the proposed Integrated Reproductive Ability Index (RAI) provides a comprehensive evaluation by combining fertility, prolificacy, lamb survival, milk production, and animal welfare indicators into a single integrated criterion. It can be recommended as an additional selection criterion for identifying breeding ewes with high reproductive efficiency and adaptive potential. The practical application of the Integrated Reproductive Ability Index (RAI) enhances the objectivity of breeding genotype selection, optimizes breeding programmes and flock reproduction, and contributes to the implementation of sustainable sheep production in accordance with the principles of the Animal Welfare, One Welfare, and One Health concepts.

Keywords: Dorper, Merinoland, Romanov sheep, crossbreeds, reproduction, prolificacy, animal welfare.

Інтегрована оцінка відтворювальної здатності вівцематок різного генетичного походження з урахуванням показників благополуччя

В. А. Шейко

Одеський державний
аграрний університет,
м. Одеса, Україна

У статті досліджено особливості формування відтворювальної здатності вівцематок різного генетичного походження в умовах сучасного інтенсивного вівчарства. Актуальність роботи зумовлена необхідністю підвищення ефективності відтворення стада шляхом поєднання генетичних ресурсів, удосконалення селекційних підходів та врахування рівня благополуччя тварин. Встановлено, що генетичне походження істотно впливає на рівень запліднюваності, багатоплідності та вихід ягнят. Помісні генотипи Dorper × Romanov і Merinoland × Romanov перевищували чистопородних Dorper за більшістю репродуктивних показників, демонструючи прояв гетерозисного ефекту. Найвищу запліднюваність (92,3 %) виявлено у Dorper × Romanov, а максимальну багатоплідність (161,1 %) – у Merinoland × Romanov. Показано, що помісні тварини характеризуються вищою молочністю (на 5,7–9,6 %), зниженим рівнем захворюваності та стресового навантаження, а також кращими показниками поведінкової активності, що свідчить про більш високий рівень благополуччя. Водночас встановлено, що найвища збереженість ягнят спостерігалася у чистопородних Dorper (90,9 %), тоді як у помісей вона дещо знижувалась унаслідок підвищеної багатоплідності. Інтегральний індекс відтворювальної здатності (ІВЗ) у дослідних групах коливався в межах 0,73–0,91 ум. од. Найвищі значення встановлено у Merinoland × Romanov (+24,7 % до дорпер), що свідчить про найповнішу реалізацію генетичної комплементарності та оптимальний баланс між продуктивністю й адаптивністю. Наукова новизна полягає в обґрунтуванні системного підходу до оцінювання відтворювальної здатності на основі інтеграції генетичних, продуктивних і показників благополуччя тварин. Отже, запропонований інтегральний індекс відтворювальної здатності (ІВЗ) забезпечує комплексне оцінювання шляхом поєднання показників запліднюваності, багатоплідності, збереженості ягнят, молочності та благополуччя тварин в єдиний інтегральний критерій. Його можна рекомендувати як додатковий селекційний критерій для відбору племінних вівцематок із високою відтворювальною ефективністю та адаптивним потенціалом. Практичне використання інтегрального індексу відтворювальної здатності (ІВЗ) дозволяє підвищити об'єктивність добору племінних генотипів, оптимізувати селекційні програми й відтворення стада, а також сприяє реалізації принципів сталого розвитку вівчарства відповідно до концепцій Animal Welfare, One Welfare та One Health.

Ключові слова: дорпер, меріноландашф, романівська, помісі, відтворення, багатоплідність, благополуччя.



Бібліографічний опис для цитування: Шейко В. А. Інтегрована оцінка відтворювальної здатності вівцематок різного генетичного походження з урахуванням показників благополуччя. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 28–33.

Introduction

In modern conditions, increasing the efficiency of sheep production based on the rational use of genetic resources, the improvement of breeding programs, and the implementation of sustainable development principles has become of particular importance. The economic performance of the sector is largely determined by the reproductive capacity of the ewe flock, since reproductive traits directly shape flock replacement rate and overall production output.

Reproductive performance in ewes is one of the most complex economically important traits, characterized by polygenic inheritance and strong environmental dependence. According to numerous studies, even a slight improvement in fertility and lamb survival rates leads to a substantial increase in production output and overall economic efficiency. Modern breeding programs increasingly consider not only productivity traits but also adaptive capacity, resistance to stress factors, and animal welfare levels [1–4].

The current development of animal science is characterized by a shift from the analysis of single economically important traits to integrated approaches that allow for a comprehensive evaluation of productivity, adaptability, and animal welfare. In sheep production, such approaches involve combining reproductive indicators with physiological, behavioral, and technological parameters, providing a more complete understanding of the mechanisms underlying productivity formation and the adaptive potential of different genotypes [5–7].

However, existing evaluation systems for reproductive performance are mainly based on individual indicators such as conception rate, prolificacy, or lamb survival, which do not provide an integrated assessment of reproductive potential. The lack of a unified integral criterion complicates comparative evaluation of ewes of different genetic backgrounds and reduces the efficiency of selection decisions [8–10].

Therefore, the development and implementation of integrated index-based approaches that combine key reproductive traits into a single composite indicator is highly relevant. Such approaches improve the objectivity of evaluation, simplify selection procedures, and create a foundation for the application of digital technologies and artificial intelligence in sheep management systems [6, 7, 9].

Recent studies emphasize that selection focused exclusively on increasing growth intensity and production traits may be accompanied by unfavorable genetic correlations with reproductive traits [10–12]. This phenomenon is known as antagonism between production and reproductive characteristics, which necessitates a revision of traditional breeding strategies.

Genetic background is one of the key factors determining the reproductive potential of animals. Different breed groups exhibit distinct biological reproductive strategies: some genotypes are oriented toward high fertility and maternal ability, while others are selected for intensive growth rate and feed conversion efficiency [1, 2, 8].

Scientific literature indicates that specialized meat breeds (e.g., Suffolk, Texel, Charollais, Dorper, etc.) demonstrate high growth performance and desirable carcass traits; however, maternal breeds, particularly Romanov sheep, are characterized by superior prolificacy and enhanced reproductive performance. This contrast provides a strong basis for the widespread use of crossbreeding as a tool to improve reproductive efficiency [11, 13].

The heterosis effect resulting from the crossing of genetically distant breeds is expressed through improved conception rates, lamb survival, and adaptive resilience. However, the magnitude of heterosis depends on the specific genetic combination, flock structure, and management conditions, which is confirmed by previous research findings [8, 10, 11].

Sejian et al. [14] demonstrated that heat stress induces hormonal imbalance, reduces oocyte quality, and increases embryonic mortality, which directly affects fertility levels in livestock.

In contemporary research, the concept of animal welfare has gained increasing importance as an integral component of efficient livestock production systems. The main welfare indicators influencing reproductive function include stress levels (cortisol concentration), behavioral responses, health status, lameness, feed quality, and postpartum recovery [5, 15, 16].

Modern scientific development is characterized by a shift toward integrated evaluation models that combine genetic parameters (estimated breeding values, EBVs), reproductive performance indicators, adaptive traits, and animal welfare metrics. Such approaches improve the accuracy of selection decisions and enhance the sustainability and resilience of production systems [7, 9, 17].

The analysis of scientific literature confirms the feasibility of transitioning from traditional breeding evaluations to integrated models that combine genetic, physiological, and animal welfare indicators. This represents a key prerequisite for improving reproductive efficiency, ensuring sustainable development of sheep production, and implementing the “One Health” concept in livestock systems. The study of modern meat genotypes and their crossbreeds is particularly relevant under conditions of climate change, transformation of production technologies, and increasing requirements for animal welfare [13, 18].

In this context, conducting a comprehensive assessment of the reproductive performance of ewes of different genetic backgrounds, taking into account welfare indicators, is an important scientific and practical task. Its implementation will contribute to improving the efficiency of breeding programs, enhancing flock reproductive performance, and ensuring the sustainable development of meat sheep production systems.

The aim of the study

The aim of this study was to investigate the patterns of reproductive ability formation in ewes of different genetic origins (Dorper, Romanov, Merinolandschaf, and their crossbreeds) and to assess animal welfare levels.

Additionally, the study aimed to evaluate the applicability of an integrated reproductive ability index for the objective assessment of ewe reproductive efficiency.

Materials and methods

The study was conducted under farm conditions at the family farm “Sheiko” in Kyiv region, Ukraine, using Dorper ewes (D) and crossbred ewes – Dorper × Romanov ($\frac{1}{2}D \times \frac{1}{2}R$) and Merinolandschaf × Romanov ($\frac{1}{2}Ml \times \frac{1}{2}R$).

During the mating and gestation periods, all ewes were maintained under identical management and environmental conditions. Reproductive performance was evaluated based on conception rate, prolificacy, and the number of live-born and stillborn lambs. Regardless of genetic origin, lambs were reared with their dams until weaning at 3 months of age.

Ewe milk production was estimated indirectly using lamb average daily gain during the first 20 days of the postnatal period, multiplied by a coefficient of 5.

Animal welfare was assessed using a comprehensive system of indicators, including body condition score (BCS), disease incidence rate, behavioral activity level, and a stress load index. These parameters reflect energy balance, immune stability, and the degree of adaptation to technological housing conditions.

To integrate the obtained data, an aggregated approach was applied. It involved the construction of a composite reproductive ability index based on normalized productive and welfare indicators using weighted coefficients.

The Integrated Reproductive Ability Index (IRAI) was calculated as a weighted sum of normalized indicators of conception rate (F), prolificacy (P), lamb survival rate (S), milk production (M), animal welfare (B), and lamb output (L). The weighting coefficients reflect the relative contribution of each trait to the overall reproductive efficiency of the flock.

The integrated index was calculated using the following formula:

$$IRAI = (F_n \times 0.20) + (P_n \times 0.20) + (S_n \times 0.20) + (M_n \times 0.15) + (B_n \times 0.15) + (L_n \times 0.10)$$

Biometric data processing was performed using Microsoft Excel software with the application of statistical functions.

Results and discussion

The reproductive performance of ewes is one of the most important economically valuable traits in sheep production, as it determines the intensity of flock reproduction, the level of output, and the overall economic efficiency of the industry. Crossbreeding between breeds provides the most rapid improvement in reproductive efficiency due to the heterosis effect, which is particularly expressed in fertility, prolificacy, and lamb survival rates.

To assess the characteristics of reproductive potential realization, a comparative analysis was conducted on purebred Dorper ewes (D) and crossbred genotypes Dorper × Romanov (D × R) and Merinoland × Romanov (Ml × R) (*Table 1*).

Table 1
Reproductive performance of ewes of different genetic origins

Genotype ♀	Mated, head	Lambd, head	Fertility, %	Lambs obtained, head			Prolificacy, %
				rams	ewes	total lambs	
D	37	31	83.8	23	21	44	141.9
D × R	52	48	92.3	36	38	74	154.2
Ml × R	41	36	87.8	28	30	58	161.1
Total	130	115	88.5	87	89	176	153.0

The analysis of the obtained data showed that the highest fertility rate was observed in crossbred Dorper × Romanov ewes (92.3 %), which exceeded purebred Dorper ewes by 8.5 percentage points. This pattern can be explained both by the manifestation of individual heterosis and by the positive influence of the Romanov breed’s genetic characteristics on the functioning of the reproductive system. It is well known that the Romanov breed is characterized by increased polyestricity, a shortened service period, and high ovulatory activity, which ensure consistently high conception rates regardless of the season.

A more important integral indicator is prolificacy, as it determines the number of lambs obtained per ewe. In the present study, the highest prolificacy level was recorded in Merinoland × Romanov crossbred ewes (161.1 %), which exceeded purebred Dorper ewes by 19.2 percentage points. The obtained results indicate a pronounced additive genetic effect of the

Romanov breed on fertility and its ability to promote multiple births.

From the perspective of modern breeding science, the obtained results confirm the concept of genetic complementarity. The Dorper breed contributes high viability, adaptability, and good maternal abilities, the Romanov breed provides high fertility and prolificacy, while the Merinoland breed is characterized by a satisfactory level of milk production and the capacity to rear multiple offspring. The combination of these genetic resources makes it possible to form new genotypes with more efficient realization of reproductive potential.

From an economic standpoint, the observed differences are of considerable practical importance. An increase in prolificacy by only 10–15 % can significantly enhance the output of marketable young stock without additional costs for maintaining the breeding flock. In the present study, the superiority of crossbred genotypes in terms of the number of lambs obtained ranged from

31.8 to 68.2 %, which ensures a substantial increase in lamb production profitability and shortens the payback period of breeding programs.

In modern sheep breeding, the level of milk production is considered one of the key criteria for assessing maternal traits, adaptive capacity, and animal welfare. Milk yield determines the intensity of lamb growth during the first weeks of life, when maternal milk is virtually the sole source of energy, protein, immunoglobulins, minerals, and biologically active compounds.

According to current scientific understanding, approximately 70–85 % of the variation in lamb live weight during the first 3–4 weeks of life is determined by the milk production level of the ewe. Studies have shown that the correlation between ewe milk yield and average daily gain of lambs during the suckling period may reach $r=0.70\text{--}0.92$, indicating an extremely strong biological relationship between these traits [8, 19–21].

Overall, it was established that the crossbred Dorper $\times$ Romanov and Merinoland $\times$ Romanov genotypes exceeded purebred Dorper ewes in daily milk yield by 5.7–9.6 %, and in total milk yield over 21 days of lactation by 5.7–9.4 % (**Table 2**). Such a consistent advantage indicates a pronounced heterosis effect, which in this case is manifested through increased secretory activity of the mammary gland and more efficient utilization of dietary metabolic energy.

Table 2
Milk production of ewes of different genetic origins, $M \pm SE$

Genotype ♀	n	Average daily lamb weight gain, kg	Milk yield of ewes, kg	Milk yield over 21 days of lactation, kg
D	31	0.298 $\pm$ 0.06	1.527 $\pm$ 0.07	32.08 $\pm$ 0.92
D $\times$ R	48	0.281 $\pm$ 0.04	1.614 $\pm$ 0.08	33.91 $\pm$ 1.07
MI $\times$ R	36	0.289 $\pm$ 0.06	1.673 $\pm$ 0.07	35.09 $\pm$ 1.35
Total	115	0.288 $\pm$ 0.02	1.609 $\pm$ 0.04	33.87 $\pm$ 0.83

A particularly notable finding is that the highest milk yield values were obtained in the Merinoland $\times$ Romanov genotype. This indicates not only the presence of heterosis but also a genetic complementarity effect. Merinoland sheep are characterized by a relatively well-developed lactation ability and the capacity to rear multiple offspring, whereas Romanov sheep provide high ovulatory activity. Their combination forms a biologically balanced system in which high prolificacy is not accompanied by a functional “deficit” in milk production.

It should also be taken into account that the increased milk yield in crossbred ewes occurred against the background of previously established higher prolificacy. This is particularly important, since in multiple births competition between lambs for milk intake and a reduction in individual weight gains are usually observed. However, in the present study, lamb growth intensity remained stable (0.281–0.298 kg), indicating sufficient milk supply even under increased physiological load on the maternal organism. The Merinoland $\times$ Romanov genotype is especially valuable, as it demonstrates the highest milk productivity, which is crucial for rearing

multiple lambs without additional costs for artificial feeding.

Thus, the obtained data confirm that ewe milk yield is an integral trait formed under the influence of complex interactions between genotype and physiological adaptation mechanisms, while its increase in crossbred animals represents a direct manifestation of heterosis and genetic complementarity of the parental breeds.

The assessment of lamb survival to weaning is an important stage in the comprehensive analysis of reproductive efficiency in sheep production, as it allows for determining the actual realization of ewe reproductive potential in relation to their genetic origin. This indicator integrates the effects of prolificacy, milk production, maternal abilities, and the level of lamb adaptation to early postnatal development conditions.

Table 3 presents data on the number of lambs at birth and at weaning, as well as the calculated survival rate in ewes of different genotypes. The obtained results indicate a high overall level of lamb survival in all experimental groups (86.5–90.9 %), which reflects adequate feeding levels, appropriate housing conditions, and a sufficient degree of maternal behavior in ewes.

Table 3
Survival of experimental lambs

Indicator	Genotype		
	D	D $\times$ R	MI $\times$ R
Number of lambs at birth, head	44	74	58
Number of lambs at weaning, head	40	64	51
Including ram lambs	21	31	25
Including ewe lambs	19	33	26
Survival rate, %	90.9	86.5	87.9

The highest lamb survival rate was observed in purebred Dorper ewes (90.9 %). This may be explained by their strong constitutional robustness, stable adaptation to various environmental conditions, and relatively lower intra-litter competition among lambs.

In the Dorper $\times$ Romanov and Merinoland $\times$ Romanov crossbreds, lamb survival decreased to 86.5–87.9 %. This phenomenon has a clear biological explanation and is associated with a “resource allocation” effect under conditions of multiple births: an increased number of lambs per litter leads to higher competition for colostrum intake during the first hours of life, which directly affects the survival of weaker individuals.

In modern animal production, the assessment of animal welfare is a key component in interpreting both productive and reproductive traits, as the physiological state of the organism determines the level of expression of genetic potential. According to the One Welfare concept, productivity, health, and behavioural status of animals are considered as an integrated system in which any disruption of homeostasis manifests as reduced reproductive efficiency, milk yield, and offspring viability.

The obtained results demonstrate a clear systemic pattern: improvement of the genetic structure through crossbreeding is accompanied by simultaneous optimization of welfare indicators, indicating a deep physiological integration of productive and adaptive traits (**Table 4**).

Table 4

Welfare indicators of ewes of different genetic origins, M±SE

Genotype ♀	BCS (points)	Disease incidence, %	Activity (arbitrary units)	Stress indicator (relative level)
D	3.2±0.1	16.8±1.3	6.4±0.3	0.60±0.03
D × R	3.4±0.1	11.2±1.0	7.3±0.2	0.52±0.02
MI × R	3.5±0.1	8.9±0.8	7.7±0.2	0.47±0.02

The highest BCS values were recorded in the Merinoland × Romanov genotype (3.5 points), indicating an optimal energy balance and efficient conversion of nutrients into productive functions. In the Dorper × Romanov group, this indicator was 3.4 points, while in purebred Dorper ewes it was 3.2 points. From a physiological perspective, stable BCS values within the range of 3.2–3.5 are considered optimal for reproductive ewes; however, the higher values observed in crossbred animals indicate more efficient regulation of energy metabolism, reduced catabolic load during lactation and the postpartum period, and better adaptation to energy-demanding phases of the reproductive cycle.

The incidence of clinical disease was markedly reduced in crossbred genotypes, decreasing from 16.8 % in Dorper to 11.2 % in Dorper × Romanov and 8.9 % in Merinoland × Romanov. This reflects enhanced immunological stability in crossbred animals, which is a typical manifestation of heterosis.

Behavioral activity increased from purebred Dorper ewes (6.4 arbitrary units) to Merinoland × Romanov (7.7 arbitrary units). An increase in locomotor activity in the absence of elevated stress responses is considered a positive indicator of physiological welfare, normal neuroendocrine status, and the absence of chronic discomfort.

A systematic analysis of welfare indicators reveals an important pattern: genotypes with better welfare parameters simultaneously exhibit higher reproductive and milk productivity, which confirms the concept of biological integration between productive and adaptive systems of the organism.

Overall, the crossbred Dorper × Romanov and Merinoland × Romanov genotypes are characterized by improved energy balance (higher BCS), reduced disease incidence (by 5.6–7.9 %), increased behavioral activity, and lower stress load (by up to 21.7 % compared with Dorper). These changes create a favorable physiological background that directly contributes to improved fertility, prolificacy, and milk yield, as described above.

Of particular importance is the fact that the Merinoland × Romanov genotype demonstrates the best balance between productivity and welfare, which allows it to be considered a promising model for the development of highly efficient maternal flocks under intensive sheep production systems.

The integrated reproductive ability index (IRA) is a generalized multifactorial indicator that allows for a comprehensive assessment of the efficiency of reproductive potential realization in ewes, taking into account the main components of reproduction. Its structure typically includes fertility, prolificacy, lamb survival, and indirectly milk production and animal welfare level.

The obtained results indicate a significant influence of genetic origin on the integrated reproductive efficiency of ewes. The lowest IRA value was recorded in purebred Dorper sheep (0.73 a.u.), which was taken as the baseline reference level (*Table 5*).

Table 5

Integrated reproductive ability index (IRA) of ewes of different genetic origins

Genotype ♀	IRA (arbitrary units)	Deviation from Dorper, %
D	0.73	–
D × R	0.86	+17.8
MI × R	0.91	+24.7

Crossbred genotypes demonstrate a pronounced increase in the integrated reproductive ability index. In the Dorper × Romanov sheep group, the IRA reached 0.86 a.u., which is 17.8 % higher than the baseline level. This indicates effective realization of the heterosis effect, manifested in improved fertility and overall reproductive activity.

The highest IRA value was recorded in the Merinoland × Romanov genotype (0.91 a.u.), exceeding the purebred Dorper by 24.7 %. This reflects the most complete expression of genetic complementarity between the parental breeds, where the combination of high milk production and reproductive activity ensures optimal integration of all components of the reproductive system.

The IRA does not represent an isolated trait but rather a systemic property of the organism that integrates reproductive, productive, and adaptive characteristics. It was established that Dorper × Romanov crossbreds provide a substantial increase in reproductive performance, while Merinoland × Romanov exhibits the maximum IRA value and the best balance between the quantity and quality of offspring.

Conclusions

The conducted study demonstrates the superiority of crossbred genotypes over purebred Dorper sheep in most reproductive performance traits. The highest fertility rate was recorded in Dorper × Romanov ewes (92.3 %), whereas the highest prolificacy was observed in Merinoland × Romanov crossbreds (161.1 %). Particular attention should be given to Dorper × Romanov crossbred ewes, which combine high fertility, considerable prolificacy, and an increased number of lambs per ewe, making them promising for use in breeding and selection programs. The highest level of lactation performance was identified in Merinoland × Romanov crossbreds, indicating the appropriateness of this genotype for the formation of highly productive maternal flocks. An improvement in welfare indicators was also observed in crossbred animals, including a reduction in disease incidence to 8.9 % and a decrease in the stress index to 0.47. The integrated reproductive ability index (IRA) in the studied ewes ranged from 0.73 to 0.91 a.u. The Merinoland × Romanov genotype was identified as the most promising, combining an optimal balance between productivity and offspring viability. It was established that the maximum realization

of the genetic potential of ewes is possible only under optimal welfare conditions, and the use of crossbred genotypes represents an effective tool for improving reproductive performance in sheep production.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The author confirms that the study was conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), national ethical regulations, and international standards (NIH, ARRIVE guidelines).

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The author states that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

None.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

During the preparation of this work, the author used ChatGPT (OpenAI) for language polishing, improving readability, and translating text segments. After using this tool, the author reviewed and edited the content as needed and takes full responsibility for the final manuscript.

References

- Kramarenko, A. S., Kramarenko, S. S., Lugovoy, S. I., & Havryliuk, K. I. (2020). Influence of genetic and non-genetic factors on the reproductive traits in ewes. *Taurian Scientific Herald*, 114, 189–195. <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2020.114.22>
- Areb, E., Getachew, T., Kirmani, M., G. silase, T., & Haile, A. (2021). Estimation of co-variance components, genetic parameters, and genetic trends of reproductive traits in community-based breeding program of Bonga sheep in Ethiopia. *Animal Bioscience*, 34(9), 1451–1459. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0413>
- Mura, M. C., Luridiana, S., Bodano, S., Daga, C., Cosso, G., Diaz, M. L., Bini, P. P., & Carcangiu, V. (2014). Influence of melatonin receptor 1A gene polymorphisms on seasonal reproduction in Sarda ewes with different body condition scores and ages. *Animal Reproduction Science*, 149(3–4), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.022>
- Montgomery, G. W. (2024). Genetic regulation of ovulation rate and multiple births. *Reproduction, Fertility and Development*, 36(14), RD24083. <https://doi.org/10.1071/rd24083>
- Zufferey, R., Minnig, A., Thomann, B., Zwyzgart, S., Keil, N., Schüpbach, G., Miserez, R., Zanolari, P., & Stucki, D. (2021). Animal-based indicators for on-farm welfare assessment in sheep. *Animals*, 11(10), 2973. <https://doi.org/10.3390/ani11102973>
- Eteqadi, B., Hossein-Zadeh, N. G., & Shadparvar, A. A. (2017). Genetic analysis of basic and composite reproduction traits in Guilan sheep. *Annals of Animal Science*, 17(1), 105–116. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0016>
- Santos, B. F. S., van der Werf, J. H. J., Gibson, J. P., Byrne, T. J., & Amer, P. R. (2017). Genetic and economic benefits of selection based on performance recording and genotyping in lower tiers of multi-tiered sheep breeding schemes. *Genetics Selection Evolution*, 49(1), e10. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0281-2>
- Notter, D. (2008). Genetic aspects of reproduction in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(s2), 122–128. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01151.x>
- Zhulinska, O. S., & Lobachova, I. V. (2020). Correction of ewes' reproductive function in the early postpartum period. *Scientific Progress & Innovations*, 4, 195–209. <https://doi.org/10.31210/visnyk2020.04.25>
- Safari, E., Fogarty, N. M., Gilmour, A. R., Atkins, K. D., Mortimer, S. I., Swan, A. A., Brien, F. D., Greeff, J. C., & van der Werf, J. H. J. (2007). Across population genetic parameters for wool, growth, and reproduction traits in Australian Merino sheep. 2. Estimates of heritability and variance components. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(2), 177–184. <https://doi.org/10.1071/ar06162>
- Fogarty, N. M., & Mulholland, J. G. (2013). Seasonal reproductive performance of crossbred ewes in intensive lamb-production systems. *Animal Production Science*, 54(6), 791–801. <https://doi.org/10.1071/an12434>
- Hameed Ajafar, M., Hasan Kadhim, A., & Mohammed AL-Thuwaini, T. (2022). The reproductive traits of sheep and their influencing factors. *Reviews in Agricultural Science*, 10(0), 82–89. https://doi.org/10.7831/ras.10.0_82
- Lesnovska, O. V. (2015). Vidtvoriuvalni yakosti ovets riznykh henotypiv [Reproductive qualities of ewes of different genotypes]. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Naukovo-Doslidnoho Tsentru Biobezpeky ta Ekolohichnoho Kontroliu Resursiv APK Dnipropetrovskoho Derzhavnoho Ahrarno-Ekonomichnoho Universytetu*, 3(2), 129–133. (in Ukrainian)
- Sejian, V., Bhatta, R., Gaughan, J. B., Dunshea, F. R., & Lacetera, N. (2018). Review: Adaptation of animals to heat stress. *Animal*, 12, s431–s444. <https://doi.org/10.1017/s1751731118001945>
- Broom, D. (2021). Farm animal welfare: A key component of the sustainability of farming systems. *Veterinarski Glasnik*, 75(2), 145–151. <https://doi.org/10.2298/vetgl210514007b>
- Munoz, C., Campbell, A., Hemsworth, P., & Doyle, R. (2017). Animal-based measures to assess the welfare of extensively managed ewes. *Animals*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.3390/ani8010002>
- Maria, G. A. (1995). Estimates of variances due to direct and maternal effects for reproductive traits of Romanov sheep. *Small Ruminant Research*, 18(1), 69–73. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(95\)00717-y](https://doi.org/10.1016/0921-4488(95)00717-y)
- Tec Canché, J. E., Magaña Monforte, J. G., & Segura Correa, J. C. (2015). Environmental effects on productive and reproductive performance of Pelibuey ewes in Southeastern México. *Journal of Applied Animal Research*, 44(1), 508–512. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1102730>
- Kleemann, D. O., Walker, S. K., Ponzone, R. W., Gifford, D. R., Walkley, J. R. W., Smith, D. H., Grimson, R. J., Jaensch, K. S., Walkom, S. F., & Brien, F. D. (2015). Effect of previous reproductive performance on current reproductive rate in South Australian Merino ewes. *Animal Production Science*, 56(4), 716–725. <https://doi.org/10.1071/an15114>
- Thomson, B. C., Smith, N. B., & Muir, P. D. (2021). Effect of birth rank and age at first lambing on lifetime performance and ewe efficiency. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 64(4), 529–539. <https://doi.org/10.1080/00288233.2020.1745853>
- Kleemann, D. O., Lowe, A. M., & Weaver, A. C. (2026). Reproductive efficiency in sheep: Estimates and relationships with fertility, fecundity and lamb survival. *Animals*, 16(11), 1608. <https://doi.org/10.3390/ani16111608>

ORCID

V. Sheiko 

<https://orcid.org/0009-0008-5208-8821>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Behavioral reactions, welfare and productivity of sows using different holding systems during lactationD. Prytyka¹ | Y. Dereza² | A. Shostia² | S. Usenko² | L. Kuzmenko² | V. Slynko² | O. Izhboldina³ | O. Makhoviy² | V. Morozov² | S. Korsakov² | V. Prunencko²**Article info**

Correspondence Author

Y. Dereza

E-mail:

yuliia.dereza@pdau.edu.ua¹ Sumy National Agrarian University,
160 Herasyma Kondratieva Str., Sumy, 40021, Ukraine² Poltava State Agrarian University,
Skovorody Str., 1/3, Poltava, 36003, Ukraine³ Dnipro State Agrarian and Economic University,
25, Serhiya Yefremova Str., Dnipro, 49000, Ukraine**Citation:** Prytyka, D., Dereza, Y., Shostia, A., Usenko, S., Kuzmenko, L., Slynko, V., Izhboldina, O., Makhoviy, O., Morozov, V., Korsakov, S., & Prunencko, V. (2026). Behavioral reactions, welfare and productivity of sows using different holding systems during lactation. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 34–47. doi: 10.31210/spi2026.29.02.06

Improving the welfare of lactating sows while maintaining high reproductive performance remains one of the major challenges in modern pig production. This study aimed to evaluate the effects of an alternative farrowing system consisting of individual pens with deep permanent bedding and free access to a communal resting area, compared with conventional fixed farrowing crates with slatted flooring, on sow behaviour, welfare, lactational performance, and reproductive traits. A comprehensive behavioural assessment was conducted throughout lactation using ethological observations combined with an integrated welfare evaluation. The alternative housing system significantly increased physical activity and the time sows spent in an upright posture while encouraging the use of the communal resting area. Despite these behavioural changes, the total daily resting time remained similar between the housing systems (702.2±13.7 vs. 696.6±12.8 min/day; $p>0.05$). Free movement almost completely eliminated stereotypic behaviour, reducing its frequency by more than 95 % ($p<0.001$), and improved the integrated welfare index from 67.4 to 89.6 points, corresponding to an increase from a satisfactory to a very good welfare level. Maternal behaviour was not adversely affected, indicating that sow–piglet interactions were maintained under the alternative housing conditions. Housing system had no significant effect on litter size, piglet birth weight, or litter weight at birth. Although sows kept in the alternative system consumed slightly more feed because of greater physical activity, their lactational performance was only marginally lower, resulting in a slight reduction in litter weight at weaning. Nevertheless, integrated reproductive performance indices remained comparable between the two housing systems. The findings demonstrate that individual farrowing pens with free access to a communal resting area and deep sand–straw bedding substantially improve behavioural welfare without compromising the reproductive performance of lactating sows. The proposed housing system represents a promising welfare-oriented alternative for implementation in modern commercial pig production.

Keywords: lactating sow, farrowing system, animal welfare, behaviour, physical activity, stereotypic behaviour, maternal behaviour, lactational performance, reproductive performance.**Поведінкові реакції, благополуччя і продуктивність свиноматок за використання різних систем утримання у період лактації**Д. В. Притика¹ | Ю. Ф. Дереза² | А. М. Шостя² | С. О. Усенко² | Л. М. Кузьменко² | В. Г. Слинько² | О. О. Іжболдіна³ | О. Г. Маховий² | В. Р. Морозов² | С. В. Корсаков² | В. О. Пруненко²¹ Сумський національний аграрний університет,
м. Суми, Україна² Полтавський державний аграрний університет,
м. Полтава, Україна³ Дніпровський державний аграрно-економічний університет,
м. Дніпро, Україна

У роботі наведено результати дослідження впливу різних систем утримання підсисних свиноматок на поведінку, рівень благополуччя, молочну та відтворювальну продуктивність. Метою дослідження було визначити ефективність альтернативної системи утримання, яка передбачає використання індивідуальних кліток із глибокою незмінною підстилкою та вільним виходом до спільної зони відпочинку, порівняно з традиційним утриманням у фіксованих індивідуальних клітках на щільній підлозі. У процесі дослідження проведено комплексну етологічну оцінку поведінки свиноматок у різні періоди лактації. Встановлено, що альтернативна система утримання забезпечувала істотне підвищення рухової активності тварин та збільшення тривалості перебування у вертикальному положенні, тоді як значна частина часу відпочинку наприкінці лактації переносилася до спільної зони. При цьому загальна тривалість відпочинку залишалася практично незмінною (702,2±13,7 проти 696,6±12,8 хв/добу; $p>0,05$). Надання свиноматкам можливості вільного пересування сприяло практично повному усуненню проявів стереотипної поведінки, інтенсивність якої зменшилася більш ніж на 95 % ($p<0,001$), а інтегральний індекс благополуччя підвищився з 67,4 до 89,6 бали, що відповідає переходу від задовільного до дуже доброго рівня благополуччя. Основні показники материнської поведінки при цьому достовірно не відрізнялися між системами утримання. Аналіз продуктивності показав, що система утримання практично не впливала на багатоплідність, великоплідність та масу гнізда при народженні. Свиноматки альтернативної групи споживали дещо більше корму внаслідок вищої рухової активності, тоді як їх молочна продуктивність була дещо нижчою, що супроводжувалося незначним зменшенням маси гнізда при відлученні. Водночас інтегральні індекси відтворювальних якостей свиноматок залишалися практично однаковими за обох систем утримання. Отримані результати свідчать, що використання індивідуальних кліток із вільним виходом до спільної зони та глибокою піщано-солом'яною підстилкою забезпечує істотне покращення поведінкового стану й рівня благополуччя підсисних свиноматок без суттєвого погіршення їхньої репродуктивної продуктивності, що підтверджує перспективність впровадження цієї технології у промислового свинарстві.

Ключові слова: підсисні свиноматки, система утримання, благополуччя тварин, поведінка, рухова активність, молочна продуктивність, відтворювальна продуктивність.**Бібліографічний опис для цитування:** Притика Д. В., Дереза Ю. Ф., Шостя А. М., Усенко С. О., Кузьменко Л. М., Слинько В. Г., Іжболдіна О. О., Маховий О. Г., Морозов В. Р., Корсаков С. В., Пруненко В. О. Поведінкові реакції, благополуччя і продуктивність свиноматок за використання різних систем утримання у період лактації. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 34–47.

Вступ

Підвищення рівня благополуччя сільсько-господарських тварин є одним із пріоритетних напрямів розвитку сучасного свиначства, що зумовлено не лише суспільними вимогами щодо гуманного поводження з тваринами, а й необхідністю забезпечення високої продуктивності, тривалого господарського використання свиноматок та економічної ефективності виробництва свинини [3, 17, 42, 43]. Особливого значення набувають технології утримання підсисних свиноматок, оскільки період опоросу та лактації характеризується максимальним фізіологічним навантаженням і є критичним щодо забезпечення благополуччя тварин [2, 18].

Традиційна система опоросу із фіксацією свиноматок була розроблена для зменшення втрат поросят від задавлювання [14, 30]. Водночас численні дослідження свідчать, що тривале утримання у фіксованих клітках негативно впливає на фізіологічний стан, поведінку та загальний рівень благополуччя свиноматок, обмежує прояв природної поведінки, дослідницької активності, гніздобудування й взаємодії з приплодом, що сприяє розвитку стереотипів і хронічного стресу [5, 8, 29, 31].

Згідно з рекомендаціями EFSA, одним із перспективних напрямів розвитку галузі є впровадження систем вільного або тимчасово обмеженого утримання, які забезпечують реалізацію природної рухової та материнської поведінки свиноматок [9, 12, 18]. Основою сучасної оцінки благополуччя є аналіз поведінкових реакцій, які вважаються найбільш чутливими індикаторами умов утримання [7, 16, 46]. Експериментальні дані також свідчать про позитивний вплив систем вільного утримання на благополуччя свиноматок під час лактації [25]. Сучасні підходи до оцінювання благополуччя передбачають урахування не лише фізіологічного стану, а й етологічних потреб та поведінкових реакцій тварин [28]. Особливу увагу приділяють проявам стереотипної поведінки, інтенсивність яких істотно зростає за фіксованого утримання та значно знижується у групових системах завдяки можливості вільного пересування і соціальної взаємодії [1, 19, 34].

Доведено, що альтернативні системи утримання сприяють підвищенню рухової активності, дослідницької поведінки та підтриманню кращого функціонального стану опорно-рухового апарату свиноматок [4, 10, 21, 40]. Разом із тим, питання повної відмови від фіксації під час опоросу залишається дискусійним через ризик задавлювання поросят [13, 23, 33, 38, 39]. Проте сучасні дослідження свідчать, що належна конструкція станків і ефективний менеджмент дозволяють мінімізувати ці ризики без погіршення виробничих показників [3, 11, 22, 43, 45, 46]. Зокрема, Moustsen et al. встановили, що тимчасова фіксація свиноматок у перші дні після опоросу може знижувати смертність поросят [32]. Водночас порівняння вільного та тимчасово обмеженого опоросу свідчить про можливість застосування альтернативних систем за умови належної організації технологічного процесу [35].

Важливими складовими сучасної оцінки благополуччя є аналіз материнської поведінки, автоматизований моніторинг поведінкових реакцій та застосування методів якісної оцінки поведінки (QBA), що забезпечують комплексне визначення емоційного та фізіологічного стану тварин [24, 26, 36, 37, 44]. Крім поведінкових змін, тривале обмеження рухової активності асоціюється з розвитком уражень кінцівок, плечових виразок і погіршенням вгодованості свиноматок [6]. Водночас результати комплексних досліджень показують, що високі показники здоров'я, репродуктивної продуктивності та благополуччя забезпечуються поєднанням належних умов утримання, ефективного менеджменту та ветеринарного супроводу [9].

Отже, перехід від традиційних систем із постійною фіксацією свиноматок до альтернативних технологій вільного або частково обмеженого утримання є одним із ключових напрямів розвитку сучасного свиначства. Незважаючи на значний обсяг досліджень, комплексна інтегральна оцінка благополуччя підсисних свиноматок із використанням поведінкових індикаторів та їхнього взаємозв'язку з продуктивними показниками залишається недостатньо вивченою, що й визначило актуальність проведення власних досліджень.

Мета дослідження

Метою дослідження було визначити вплив різних систем утримання на поведінкові реакції, рівень благополуччя та продуктивність підсисних свиноматок, а також оцінити ефективність альтернативної технології групового утримання.

Матеріали і методи

Експериментальні дослідження виконували в умовах промислового свиначського підприємства на підсисних свиноматках генетики данської компанії Breeders. Для встановлення впливу різних систем утримання на поведінкові реакції, рівень благополуччя та продуктивність тварин відповідно до схеми досліду (*табл. 1*) було сформовано дві групи-аналоги по 20 голів у кожній. Формування груп здійснювали за методикою Ладика та ін. (2023) з урахуванням віку, живої маси, паритету та багатоплідності свиноматок [46].

У період поросності тварин утримували стабільною технологічною групою чисельністю 60 голів. Годівлю організовували із застосуванням електронної станції індивідуального дозування корму Mannebeck (Німеччина) (*рис. 1*). Свиноматки перебували у групових секціях із частково щільною бетонною підлогою, що відповідало прийнятій у господарстві технології.

За сім діб до очікуваного опоросу зі сформованої технологічної групи методом аналогів було відібрано дві піддослідні групи, після чого тварин перевели до цеху опоросу. Свиноматок контрольної групи розміщували у стандартних індивідуальних станках із постійною фіксацією (*рис. 2*).

Для тварин дослідної групи використовували секції, обладнані легкозбірними індивідуальними

станками для опоросу (рис. 3). Після відкриття цих станків свиноматки отримували можливість вільно пересуватися в межах загальної секції відповідно до технології групової лактації.

Ветеринарне забезпечення, параметри мікроклімату, система напування, режими годівлі та технологія вирощування поросят в обох групах були однаковими й відповідали технологічному регламенту господарства.

Таблиця 1

Схема експериментальних досліджень

Показник	Група свиноматок та її призначення	
	I контрольна	II дослідна
Спосіб утримання свиноматок в період встановленої поросності	стабільними групами по 20 голів	
Спосіб утримання свиноматок в підсисний період	індивідуальне утримання в станках з фіксацією по центру впродовж всього періоду лактації	групове утримання стабільною групою 20 голів з індивідуальним місцем для побудови поросного гнізда
Система підлоги при утриманні свиноматок з поросятами	щільна полімерна для поросят і чавунна для свиноматки	суцільна бетонна з шаром піщано-солом'яної підстилки
Площа підлоги для утримання 1 свиноматки та гнізда поросля в секції, м ²	4,5	16,2
Площа індивідуального станка для свиноматки з поросятами, м ²	4,5	5,28
Загальна площа секції для групи свиноматок, м ²	120	378
Фронт годівлі для свиноматок, м	0,60	0,25
Годівниця для свиноматок	індивідуальна в станку	групова бункерна самогодівниця на кормовому столі
Напування для свиноматки	індивідуальна соскова в станку	групова соскова на кормовому столі
Напування для поросят	групова мисочкова в станку впродовж усього періоду	групова мисочкова в станку до 14 доби а далі соскова на кормовому столі для свиноматок
Підгодовля поросят	групова годівниця в станку	групова самогодівниця на кормовому столі для поросят



Рис. 1. Умови утримання свиноматок піддослідних груп в період встановленої поросності



Рис. 2. Умови утримання свиноматок контрольної групи в підсисний період



Рис. 3. Умови утримання свиноматок дослідної групи в підсисний період

Таким чином, єдиним експериментальним чинником, за яким відрізнялися піддослідні групи, була система утримання свиноматок у підсисний період. У контрольній групі застосовували традиційне індивідуальне утримання з постійною фіксацією тварин, тоді як у дослідній – групову систему з використанням глибокої незмінної піщано-солом'яної підстилки та можливістю вільного пересування свиноматок.

У контрольній групі свиноматок утримували в традиційних індивідуальних станках для опоросу з фіксацією тварини у центральній частині станка впродовж усього лактаційного періоду (рис. 2). Загальна площа одного станка становила 4,5 м². Конструкція підлоги була комбінованою: у зоні розміщення свиноматки використовували чавунну щільну підлогу, а у відділенні для поросят – полімерну щільну. Кожен станок обладнували індивідуальною годівницею та сосковою напувалкою для свиноматки. Для поросят передбачали групову мисочкову напувалку і групову годівницю, які розташовувалися безпосередньо в межах станка. Свиноматок дослідної групи після опоросу утримували незмінною групою чисельністю 20 голів на глибокій піщано-солом'яній підстилці. Кожній тварині надавали індивідуальне місце для опоросу та відпочинку площею 5,28 м² із вільним виходом до спільної секції. Загальна площа приміщення становила 378 м², що забезпечувало 16,2 м² на одну свиноматку разом із приплодом. Підлога в секції була суцільною бетонною, поверх якої використовували глибоку незмінну піщано-солом'яну підстилку.

Годівлю свиноматок дослідної групи організовували із використанням групової бункерної самогодівниці, розміщеної на кормовому столі, що забезпечувала тваринам постійний доступ до корму. Напування здійснювали за допомогою групових соскових напувалок із можливістю регулювання їх висоти відповідно до потреб тварин. До досягнення 14-добового віку поросята користувалися знімними мисочковими напувалками, встановленими в індивідуальних станках для опоросу. Після цього молодняк мав вільний доступ до соскових напувалок, розміщених у зоні кормового столу. Підгодовлю поросят здійснювали із групової самогодівниці.

У контрольній групі фронт годівлі для свиноматок становив 0,60 м на одну голову. У дослідній групі цей показник дорівнював 0,25 м, однак менша довжина фронту годівлі компенсувалася безперервним доступом тварин до бункерної самогодівниці, що виключало конкуренцію за корм і забезпечувало можливість його споживання у будь-який час доби.

Поведінкові реакції свиноматок вивчали методом безперервного цілодобового відеоспостереження із використанням цифрової системи відеореєстрації відповідно до методики Kim et al. (2025) [26]. Спостереження проводили на 2-, 10-, 18- та 27-му добу лактації. Для індивідуальної ідентифікації тварин під час аналізу відеозаписів на поверхню тіла кожної свиноматки наносили розпізнавальні фігури спеціальним аерозольним маркером.

Під час аналізу відеоматеріалів реєстрували основні поведінкові реакції тварин, зокрема тривалість відпочинку, лежання, стояння, рухової активності та споживання корму. Окремо враховували прояви стереотипної поведінки, а також показники материнської поведінки, включаючи кількість актів годування поросят, їх тривалість і сумарний час лактації впродовж доби.

Відеореєстратори встановлювали над п'ятьма експериментальними станками таким чином, щоб у поле їхнього огляду повністю потрапляли місце опоросу, зона відпочинку свиноматки й поросят, ділянки годівлі та напування, а також простір, призначений для вільного пересування тварин. Таке розміщення обладнання забезпечувало безперервний контроль за всіма видами поведінкової активності без втручання у перебіг технологічного процесу.

Реєстрацію поведінки проводили одночасно в обох піддослідних групах у визначені дні лактації впродовж 24 годин безперервного спостереження. Отримані відеозаписи підлягали суцільному перегляду із фіксацією кожного поведінкового акту з точністю до однієї секунди. На підставі отриманих результатів для кожної групи складали групову етограму, яка характеризувала структуру добової поведінки свиноматок і дозволяла визначити як тривалість, так і частоту прояву окремих форм поведінки.

Кількісну характеристику поведінкових реакцій здійснювали шляхом визначення тривалості кожного виду активності в годинах за добу з подальшим розрахунком його питомої частки у відсотках від загальної тривалості спостереження, що становила 24 години. Такий підхід забезпечував можливість об'єктивного порівняння структури поведінки свиноматок за різних систем утримання та дозволяв комплексно оцінити вплив досліджуваного технологічного чинника на рівень їхнього благополуччя.

Для комплексної оцінки благополуччя підсисних свиноматок було розроблено систему поведінкових індексів, основу якої склали сучасні міжнародні підходи до оцінювання добробуту сільськогосподарських тварин. Під час її розроблення враховано концепцію благополуччя тварин, запропоновану Broom (1986), поведінковий підхід Dawkins (2004), принципи системи Welfare Quality®, висновки Європейського агентства з безпеки харчових продуктів (EFSA, 2022) щодо добробуту свиней, а також результати сучасних досліджень з етології й технології утримання свиноматок, представлені у працях Baxter et al. (2012) і Marchant-Forde (2009) [4, 7, 16, 15, 30]. Узагальнення цих наукових підходів дало змогу сформулювати комплекс поведінкових показників, який забезпечує всебічну характеристику поведінкового стану та рівня благополуччя підсисних свиноматок за різних технологій утримання.

Для оцінювання запропонованої системи визначали індекс свободи пересування (ІСП), індекс рухової активності (ІРА), індекс материнської поведінки (ІМП), індекс поведінкового стресу (ІПС), індекс поведінкового комфорту (ІПК), а також комплексний індекс благополуччя свиноматок (КІБС), який інтегрував зазначені показники в єдину систему оцінювання.

Індекс свободи пересування (ІСП) – час перебування у спільній зоні / 24.

Індекс рухової активності (ІРА) – (час пересування + час стояння) / 24.

Індекс материнської поведінки (ІМП) – загальний час годівлі поросят / 24.

Індекс поведінкового стресу (ІПС) – сумарна тривалість проявів стереотипної поведінки / 24.

Індекс поведінкового комфорту (ІПК) – (загальний час лежання + час годівлі поросят) / 24.

На основі цих індексів нами запропоновано комплексний індекс благополуччя свиноматок (КІБС), який розраховували за формулою:

$$\text{КІБС} = 0,25 \times \text{ІСП} + 0,20 \times \text{ІРА} + 0,25 \times \text{ІМП} + 0,20 \times \text{ІПК} - 0,10 \times \text{ІПС}$$

Градації комплексного індексу благополуччя свиноматок прийнято такими: до 20 – незадовільний; 21–25 – задовільний; 26–30 – добрий; понад 30 – дуже добрий.

Відтворювальну продуктивність свиноматок оцінювали за показниками багатоплідності, великоплідності, маси гнізда при народженні та відлученні, збереженості поросят і споживання корму відповідно до методики Ладика та ін. (2023) [46]. Молочну продуктивність визначали розрахунковим методом за рівнянням, запропонованим Ferreira et al. (1988), на

підставі приросту живої маси поросят за період лактації [20]. Для розрахунку використовували формулу:

$$\text{Молочна продуктивність (кг/добу)} = (4,27 \times \text{приріст живої маси поросят, кг} \times \text{кількість поросят}) / \text{тривалість лактації, діб.}$$

Для узагальненої характеристики відтворювальних якостей свиноматок застосовували інтегральні селекційно-біологічні показники. Індекс відтворювальних якостей (ІВЯ) обчислювали за методикою Лаша і Мольна в модифікації М. Д. Березовського (Ладика та ін. (2023)) [46] за формулою:

$$\text{ІВЯ} = A + 2B + 35\sigma,$$

де А – багатоплідність (кількість живонароджених поросят, гол.); В – кількість поросят при відлученні (гол.); σ – середньодобовий приріст живої маси поросят від народження до відлучення (кг).

Додатково розраховували селекційний індекс відтворювальних якостей свиноматок (СІВЯС) відповідно до методики, запропонованої Tsereniuk et al. (2010) [41]:

$$\text{СІВЯС} = 6X_1 + 9,34 \times (X_2 / X_3),$$

де X_1 – багатоплідність (гол.); X_2 – маса гнізда поросят при відлученні (кг); X_3 – тривалість лактаційного періоду (діб); 6 і 9,34 – вагові коефіцієнти, що відображають значущість окремих ознак у структурі індексу [46].

Статистичну обробку отриманих даних виконували методами варіаційної статистики у програмному середовищі Microsoft Excel 2016 відповідно до рекомендацій Kramarenko et al. (2019) [27]. Для кожного показника обчислювали середнє арифметичне значення (M) та похибку середнього ($\pm m$), після чого достовірність відмінностей між дослідними групами оцінювали за t -критерієм Стюдента. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$, високодостовірними – при $p < 0,01$, а дуже високодостовірними – при $p < 0,001$.

Результати та їх обговорення

Система утримання підсисних свиноматок суттєво впливала на просторову поведінку та структуру добового бюджету часу тварин упродовж лактаційного періоду. Аналіз отриманих результатів (**табл. 2**) свідчить, що надання свиноматкам можливості вільного переміщення за межі індивідуального станка сприяло зміні характеру використання функціональних зон приміщення та розширенню спектра реалізованих поведінкових реакцій.

У контрольній групі, де застосовували традиційну технологію утримання в індивідуальних станках із постійною фіксацією, структура поведінки тварин залишалася стабільною протягом усього періоду спостережень. Свиноматки були обмежені межами станка, тому всі основні форми активності – відпочинок, годівля, догляд за поросятами та зміна положення тіла – відбувалися в межах однієї технологічної зони.

Таблиця 2

Динаміка часу відпочинку підсисних свиноматок в індивідуальних і групових системах утримання

Показник	Час спостережень, доба							
	2		10		18		27	
Група свиноматок	I	II	I	II	I	II	I	II
Час перебування у станку для опоросу, год	24	23,19	24	19,70	24	16,79	24	15,27
Час перебування у спільній зоні, год	0	0,81	0	4,30	0	7,21	0	8,73
Час лежання у станку, включаючи годівлю поросят, год	22,8	21,71	21,12	18,96	21,06	15,60	21,12	13,31
Час відпочинку в станку лежачи, год	19,10	18,51	18,6	16,65	18,75	13,64	19,34	11,74
Час лежання у спільній зоні, год	0	0	0	1,20	0	4,29	0	5,64
Загальний час відпочинку в станку та спільній зоні, год	22,80	21,71	21,12	20,16	21,06	19,89	21,12	18,95
Загальний час відпочинку лежачи, год	19,10	18,51	18,6	17,85	18,75	17,93	19,34	17,38

На відміну від контрольної групи, у свиноматок дослідної групи відзначено поступове збільшення використання спільної зони секції, обладнаної глибокою піщано-солом'яною підстилкою. Впродовж лактації тварини активніше використовували доступний простір, що свідчить про адаптацію до альтернативної системи утримання та реалізацію природної рухової поведінки. Збільшення часу перебування поза індивідуальним місцем опоросу супроводжувалося відповідним скороченням часу перебування у станку, однак не призводило до суттєвого зниження загальної тривалості відпочинку.

Важливою особливістю дослідної системи було те, що зміна місця відпочинку не супроводжувалася зменшенням потреби тварин у відновленні. Свиноматки, маючи можливість самостійно вибирати комфортну зону, частину періоду лежання переносили із місця розташування поросят до спільної зони з підстилкою. Така поведінкова адаптація свідчить про здатність тварин активно використовувати можливості навколишнього середовища відповідно до власних фізіологічних потреб.

Отримані результати підтверджують, що система утримання з можливістю вільного переміщення змінює не стільки загальну тривалість відпочинку свиноматок, скільки його просторову організацію. У контрольній групі поведінковий репертуар залишався обмеженим конструкцією станка, тоді як у дослідній групі спостерігалася розширення поведінкових можливостей за рахунок використання додаткової площі, зміни місця відпочинку та збільшення рухової активності.

Дані **рисунка 4** демонструють відмінності у структурі добового бюджету часу свиноматок за різних систем утримання. У тварин контрольної групи частка часу перебування в межах індивідуального станка протягом усього періоду спостережень залишалася сталою, що було зумовлено конструктивними особливостями системи утримання. Натомість у свиноматок дослідної групи спостерігалася поступове збільшення частки часу, проведеного у спільній зоні, що відображає активніше використання доступного простору.

Паралельно зі зміною просторової поведінки відбувалася перебудова структури відпочинку. У контрольній групі основним місцем реалізації поведінки лежання залишався індивідуальний станок, тоді як у дослідній групі частина відпочинку поступово переміщувалася до зони з глибокою підстилкою. При цьому загальний час відпочинку

залишався відносно стабільним, що свідчить про збереження фізіологічної потреби тварин у відновленні незалежно від способу утримання.

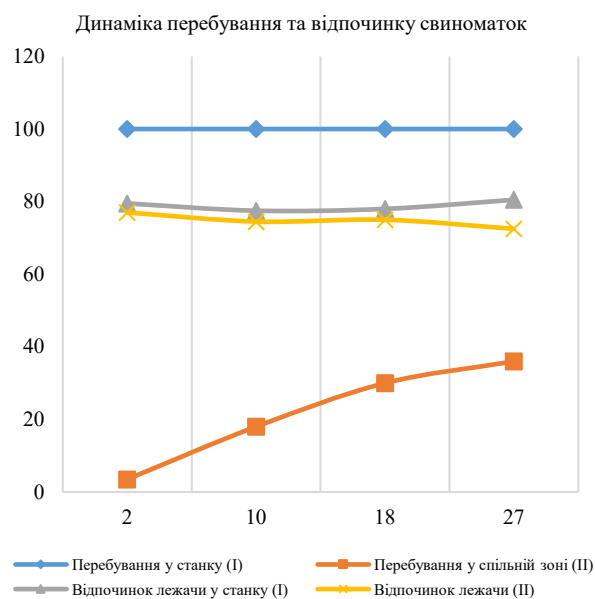


Рис. 4. Відносна динаміка відпочинку свиноматок

Таким чином, використання системи групового утримання підсисних свиноматок із доступом до додаткової зони на глибокій піщано-солом'яній підстилці забезпечувало розширення можливостей реалізації природної поведінки без суттєвого порушення добового балансу відпочинку. Зміни структури поведінки характеризувалися не скороченням періоду відпочинку, а більшою варіативністю використання простору, що є одним із важливих критеріїв оцінювання благополуччя свиноматок.

Аналіз даних **таблиці 3** показав, що система утримання істотно впливала на прояви активної поведінки підсисних свиноматок протягом лактаційного періоду. Найбільш виражені відмінності між групами стосувалися рівня рухової активності, тривалості перебування у вертикальному положенні та проявів стереотипної поведінки.

Якщо свиноматки I групи, які утримувалися у традиційних індивідуальних клітках на щільній підлозі, були практично позбавлені можливості вільного пересування, то тварини II групи завдяки наявності виходу до спільної зони мали змогу реалізовувати природну рухову активність.

Таблиця 3

Динаміка часу активних дій підсисних свиноматок в індивідуальних і групових системах утримання

Показник	Час спостережень, доба							
	2		10		18		27	
Група	I	II	I	II	I	II	I	II
Рухова активність свиноматки, год	0	0,26	0	2,12	0	2,65	0	2,88
Час споживання корму свиноматкою, год	0,43	0,55	0,61	0,68	0,71	0,77	0,73	0,81
Час стояння у станку для опоросу, год	1,20	1,48	2,88	0,74	2,94	1,19	2,88	1,96
Час стояння в спільній зоні без часу вживання кормів, год	0	0,26	0	2,1	0	2,42	0	2,49
Загальний час стояння свиноматки, год	1,63	2,29	3,49	3,52	3,65	4,38	3,61	5,26
Загальний час прояву стереотипної поведінки, год	11,33	0,36	6,8	0,25	5,67	0,13	3,4	0,17

У свиноматок I групи рухова активність була відсутньою протягом усього періоду спостережень, за винятком проявів стереотипної поведінки. Натомість у тварин II групи цей показник поступово зростав упродовж лактації. Порівняно з другою добою її тривалість до десятого дня збільшилася більш ніж у 8 разів, а до завершення лактаційного періоду – майже в 11 разів, що свідчить про активне освоєння свиноматками спільної зони після адаптації до нових умов утримання.

Тривалість споживання корму також була більшою у свиноматок II групи протягом усього періоду досліджень. Перевага над аналогами I групи становила 0,12 години (27,9 %) на другу добу, 0,07 години (11,5 %) – на десяту, 0,06 години (8,5 %) – на вісімнадцяту та 0,08 години (11,0 %) – на двадцять сьому добу лактації. Така особливість, імовірно, пов'язана з конкуренцією між тваринами за доступ до спільної годівниці, розташованої на кормовому столі.

Час перебування у вертикальному положенні в станку для опоросу характеризувався іншою закономірністю. На другу добу лактації свиноматки II групи проводили у станку стоячи на 0,28 години (23,3 %) більше, що, ймовірно, було пов'язано з адаптацією до нової системи утримання. Однак уже з десятого дня цей показник був істотно меншим порівняно з тваринами I групи: різниця становила 2,14 години (74,3%), на вісімнадцяту добу – 1,75 години (59,5 %), а на двадцять сьому – 0,92 години (31,9 %). Це, на нашу думку, пояснюється тим, що значну частину часу свиноматки II групи перебували у вертикальному положенні вже не в межах станка, а у спільній зоні.

Водночас тривалість стояння у спільній зоні закономірно зростала протягом усього періоду спостережень. Якщо на початку лактації цей показник був мінімальним, то до завершення підсисного періоду він зріс майже у 10 разів. Така динаміка свідчить про поступове освоєння тваринами додаткового простору, прояв дослідницької поведінки та підвищення рівня їхньої фізичної активності.

Унаслідок цього загальний час перебування у вертикальному положенні у свиноматок II групи

протягом більшої частини дослідження перевищував аналогічний показник у тварин I групи. На другу добу ця перевага становила 0,66 години (40,5 %), на десяту добу різниця була мінімальною – лише 0,03 години (0,9 %), однак уже на вісімнадцяту добу збільшилася до 0,73 години (20,0 %), а наприкінці лактації досягла 1,65 години (45,7 %). Таким чином, використання спільної зони сприяло збільшенню часу перебування тварин у вертикальному положенні, що є однією з ознак підвищення їхньої рухової активності.

Найбільш суттєві відмінності між альтернативними системами утримання підсисних свиноматок встановлено щодо проявів стереотипної поведінки. У свиноматок II групи її тривалість була меншою вже на другу добу на 10,97 години, або 96,8 %, порівняно з традиційною системою утримання. На десяту добу ця різниця становила 6,55 години (96,3 %), на вісімнадцяту – 5,54 години (97,7 %), а на двадцять сьому – 3,23 години (95,0%). Незважаючи на поступове зниження проявів стереотипної поведінки у свиноматок I групи впродовж лактації, її тривалість залишалася у 20–45 разів більшою, ніж у тварин за групової системи утримання.

Отже, результати досліджень свідчать, що утримання підсисних свиноматок у станках із використанням глибокої піщано-солом'яної підстилки з вільним виходом до спільної зони сприяє підвищенню рухової активності, збільшенню часу перебування у вертикальному положенні, а також зміні характеру споживання корму. Найважливішим результатом застосування системи вільного доступу до спільної зони є різке зниження проявів стереотипної поведінки (на 95–98 %), що свідчить про покращення поведінкового стану та підвищення рівня благополуччя підсисних свиноматок.

Система утримання свиноматок у період лактації певною мірою впливала на окремі прояви материнської поведінки. Аналіз даних [таблиці 4](#) свідчить, що ці відмінності були менш вираженими порівняно зі змінами показників рухової активності та структури відпочинку.

Таблиця 4

Динаміка материнської поведінки підсисних свиноматок в індивідуальних і групових системах утримання

Показник	Час спостережень, доба							
	2		10		18		27	
Група	I	II	I	II	I	II	I	II
Кількість годувань за добу, разів	28,7	25,9	24,6	23,8	24,6	22,8	16,3	18,1
Загальний час годівлі поросят, год	3,71	3,26	2,52	2,31	2,31	1,96	1,78	1,57
Тривалість одного годування, хв	7,7	7,4	6,1	5,8	5,6	5,2	6,6	5,2

Незважаючи на можливість вільного переміщення між індивідуальним станком і спільною зоною, свиноматки II групи зберігали стабільний рівень материнської поведінки, що вказує на підтримання повноцінного контакту з поросятами.

Кількість годувань поросят впродовж доби в свиноматок обох груп закономірно зменшувалася зі збільшенням віку приплоду, що відповідає фізіологічним особливостям перебігу лактації та поступовому переходу поросят до споживання престартерних кормів, які з 10-ї доби були доступні за обох систем утримання. Ймовірно, через необхідність залишати станок для споживання корму, води та здійснення актів дефекації у свиноматок II групи цей показник на другу добу лактації був меншим на 2,8 годування (9,8 %), на десятю добу – на 0,8 годування (3,3 %), а на вісімнадцяту – на 1,8 годування (7,3 %) порівняно з тваринами I групи. Водночас наприкінці лактаційного періоду спостерігалася протилежна тенденція: кількість годувань у свиноматок II групи перевищувала аналогічний показник у тварин I групи на 1,8 раза або 11,0 %. Це може свідчити про більш тривале збереження лактаційної активності у свиноматок, які мали можливість реалізовувати природну поведінку та використовувати комфортніші умови відпочинку.

Загальна тривалість годування поросят упродовж лактації закономірно скорочувалася в обох групах. У свиноматок II групи цей показник був дещо нижчим протягом усього періоду спостережень, що, ймовірно, пов'язано з необхідністю виходу із зони відпочинку для споживання корму, води та здійснення фізіологічних функцій. Різниця порівняно з тваринами I групи становила 0,45 години (12,1 %) на другу добу, 0,21 години (8,3 %) – на десятю, 0,35 години (15,2 %) – на вісімнадцяту та 0,21 години (11,8 %) – на двадцять сьому добу лактації. Проте навіть за меншої сумарної тривалості лактаційних контактів істотного погіршення материнської поведінки у свиноматок II групи не встановлено.

Тривалість окремого акта годування також поступово скорочувалася зі збільшенням віку поросят, що є характерною закономірністю лактаційного періоду. У свиноматок II групи тривалість одного ссання була дещо меншою, ніж у тварин за традиційної системи утримання. На другу добу різниця становила 0,3 хвилини (3,9 %), на десятю – 0,3 хвилини (4,9 %), на вісімнадцяту – 0,4 хвилини (7,1 %), а наприкінці лактації – 1,4 хвилини (21,2 %). Найбільша відмінність спостерігалася перед відлученням поросят, що, ймовірно, пов'язано з фізіологічним зниженням інтенсивності лактації, підвищенням самостійності молодяку та активнішим використанням престартерних кормів у підгодівельному відділенні.

Таким чином, отримані результати свідчать, що надання підсисним свиноматкам можливості вільного переміщення між індивідуальним станком і спільною зоною, де використовувалася глибока піщано-солом'яна підстилка, не спричиняло негативного впливу на основні прояви материнської поведінки. Незважаючи на незначне скорочення загального часу годування та тривалості окремих актів ссання, свиноматки II групи зберігали високу інтенсивність лактаційної активності, а наприкінці підсисного періоду

навіть частіше забезпечували доступ поросят до вимені. Це свідчить про те, що покращення умов утримання та підвищення рівня благополуччя не порушували реалізацію материнського інстинкту, а сприяли його ефективному поєднанню з природною руховою та дослідницькою поведінкою тварин.

Можливість вільного пересування за системи утримання тварин II групи істотно змінювала структуру добового бюджету часу та сприяла реалізації природної поведінки свиноматок. Як видно з **рисунка 5**, відносна динаміка рухової активності та окремих поведінкових реакцій підсисних свиноматок за різних систем утримання впродовж лактаційного періоду суттєво відрізнялася.

Найбільш виражені відмінності між тваринами піддослідних груп встановлено щодо прояву стереотипної поведінки. У свиноматок I групи її частка на початку лактації становила майже половину всього часу активної поведінки, однак упродовж періоду спостережень поступово зменшилася майже у 3,5 рази. Незважаючи на це, навіть наприкінці лактації рівень стереотипних реакцій залишався у десятки разів вищим порівняно зі свиноматками II групи. У тварин за групової системи утримання частка стереотипної поведінки протягом усього періоду дослідження не перевищувала 1,5 % добового бюджету часу, а починаючи з десятої доби лактації підтримувалася на рівні менше 1,0 %. Це свідчить про практичну відсутність поведінкових ознак хронічного стресу за умов надання тваринам можливості вільного переміщення.

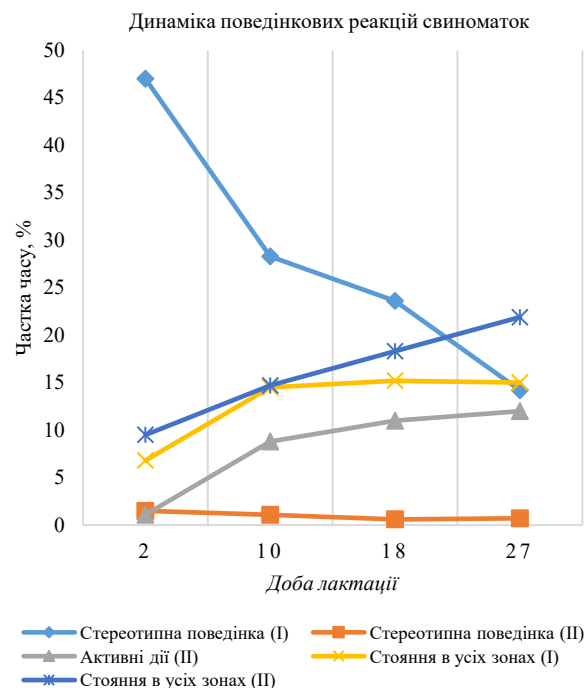


Рис. 5. Відносна динаміка рухової активності свиноматок

Водночас у свиноматок II групи відзначено поступове збільшення частки часу, що припадала на активні поведінкові дії. Якщо на початку лактації цей показник був мінімальним, то до завершення

дослідження він зріс майже у 10 разів і досяг близько 12 % добового бюджету часу. Така динаміка вказує на поступове підвищення рухової активності після адаптації тварин до нових умов утримання, а також зі збільшенням віку поросят і розширенням їхнього використання спільної зони.

Подібна закономірність спостерігалася і щодо загальної тривалості перебування свиноматок у вертикальному положенні. У тварин І групи частка часу стояння після певного збільшення в першій половині лактації надалі залишалася відносно стабільною та становила близько 15 % добового часу. Натомість у свиноматок ІІ групи цей показник поступово зростав упродовж усього періоду дослідження – від менш ніж 10 % на другу добу до майже 22 % наприкінці лактації. Таким чином, частка часу стояння у тварин альтернативної системи утримання була більш ніж удвічі вищою порівняно зі свиноматками традиційної системи.

Порівняльний аналіз поведінки тварин обох груп свідчить, що вже на десятю добу лактації частка часу перебування у вертикальному положенні була практично однаковою. Проте надалі свиноматки ІІ групи демонстрували поступове збільшення цього показника порівняно з аналогами І групи.

Таблиця 5

Динаміка поведінкових індексів підсисних свиноматок в індивідуальних і групових системах утримання

Показник	Час спостережень, доба							
	2		10		18		27	
Група	I	II	I	II	I	II	I	II
Індекс свободи пересування (ІСП)	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,0	0,6
Індекс рухової активності (ІРА)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3
Індекс материнської поведінки (ІМП)	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Індекс поведінкового стресу (ІПС)	0,5	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0
Індекс поведінкового комфорту (ІПК)	1,0	0,9	0,9	0,8	0,9	0,8	0,9	0,8
Комплексний індекс благополуччя свиноматок (КІБС)	19,6	24,5	20,6	29,7	20,9	35,7	21,3	39,1

Примітки: градації КІБС до 20 – незадовільний; 21–25 – задовільний; 26–30 – добрий; більше 30 – дуже добрий.

Використання індивідуальних станків із вільним виходом до спільної зони та глибокою піщано-солом'яною підстилкою сприяло покращенню більшості інтегральних поведінкових показників порівняно з традиційною системою утримання.

Найбільш інформативним виявився індекс свободи пересування (ІСП). У свиноматок І групи його значення протягом усього періоду спостережень залишалося нульовим через повне обмеження можливості залишати станок. Натомість у тварин ІІ групи ІСП поступово зростав і наприкінці лактації був утричі вищим, ніж на десятю добу, що свідчить про активне освоєння додаткового простору.

Подібну тенденцію встановлено й для індексу рухової активності (ІРА). У свиноматок І групи він практично не змінювався, тоді як у тварин ІІ групи вже на десятю добу був удвічі вищим, а надалі перевищував показники контрольної групи приблизно у 1,5 рази, що узгоджується з результатами етологічних спостережень.

Індекс материнської поведінки (ІМП) суттєво не відрізнявся між групами. Незначне зниження його значення у свиноматок ІІ групи на початку лактації надалі практично нівелювалося, що свідчить про

До завершення лактації різниця між групами становила майже 7 відсоткових пунктів, що підтверджує вищий рівень рухової активності та ширші можливості реалізації природних поведінкових реакцій у тварин за альтернативної системи утримання.

Отже, утримання підсисних свиноматок в індивідуальних клітках із глибокою піщано-солом'яною підстилкою та вільним виходом до спільної зони забезпечувало суттєву перебудову структури їхньої добової поведінки. Поряд із різким зниженням проявів стереотипної поведінки (понад 95 %) відзначалося поступове збільшення рухової активності та тривалості перебування у вертикальному положенні. Це свідчить про покращення фізіологічного стану й поведінкового комфорту свиноматок, підвищення рівня їхнього благополуччя та створення умов для реалізації видоспецифічної поведінки без негативного впливу на материнські функції.

Для комплексного оцінювання поведінкових реакцій свиноматок на основі результатів етологічних спостережень було розраховано систему інтегральних поведінкових індексів (табл. 5), яка дозволила кількісно оцінити вплив різних систем утримання на рівень благополуччя тварин.

відсутність негативного впливу вільного пересування на реалізацію материнської поведінки.

Найбільші міжгрупові відмінності встановлено для індексу поведінкового стресу (ІПС). У свиноматок ІІ групи його значення протягом усього дослідження залишалося близьким до нульового рівня, тоді як у тварин І групи, незважаючи на поступове зниження, воно залишалося значно вищим навіть наприкінці лактації. Це підтверджує негативний вплив тривалого обмеження рухової активності на поведінковий стан свиноматок.

Індекс поведінкового комфорту (ІПК) характеризувався відносною стабільністю в обох групах. Деяко вищі його значення у свиноматок І групи були зумовлені більшою тривалістю відпочинку в умовах обмеженої рухової активності. Проте цей показник не відображає повною мірою реальний рівень благополуччя, оскільки збільшення часу відпочинку не виключає розвитку хронічного стресу, що підтверджують результати оцінювання ІПС.

Найбільш узагальнену оцінку забезпечував комплексний індекс благополуччя свиноматок (КІБС). У тварин І групи його значення змінювалися незначно – приріст становив лише 1,7 бали (близько

9 %), що відповідало переходу від незадовільного до задовільного рівня благополуччя. У свиноматок II групи КІБС збільшився на 14,6 бали (майже на 60 %), досягнувши вже на десяту добу категорії «добрий», а починаючи з вісімнадцятої доби – категорії «дуже добрий».

Таким чином, результати інтегральної оцінки підтверджують переваги альтернативної системи утримання, яка передбачає використання індивідуальних станків із вільним виходом до спільної зони. Така технологія забезпечує підвищення свободи пересування та рухової активності, практично усуває прояви поведінкового стресу, не порушує материнської поведінки та сприяє істотному покращенню загального рівня благополуччя підсисних свиноматок.

Аналіз даних **таблиці 6** показав, що застосування різних систем утримання у період лактації не спричинило суттєвих змін показників відтворювальної продуктивності свиноматок. Це закономірно, оскільки більшість репродуктивних ознак формується ще на попередніх етапах відтворного циклу, коли всі

тварини перебували в однакових умовах годівлі та утримання. Водночас отримані результати свідчать, що використання індивідуальних станків із подальшим вільним виходом до спільної зони не погіршує перебіг опоросу, життєздатність новонароджених поросят і не знижує відтворювальну ефективність свиноматок.

За всіма досліджуваними репродуктивними показниками міжгрупові відмінності не перевищували 5 %, що свідчить про технологічну рівноцінність обох систем утримання щодо забезпечення відтворювальних якостей свиноматок. З огляду на встановлене покращення поведінкових показників і підвищення рівня благополуччя тварин, альтернативну систему утримання можна розглядати як більш ефективну без ризику зниження репродуктивної продуктивності.

Аналіз даних **таблиці 7** свідчить, що система утримання певною мірою впливала на рівень споживання корму та молочну продуктивність підсисних свиноматок, що, ймовірно, було пов'язано з різною інтенсивністю їхньої рухової активності.

Таблиця 6

Продуктивність свиноматок в індивідуальних і групових системах утримання під час опоросу

Показник	Група свиноматок	
	I (контрольна) n=20	II (дослідна) n=20
Спосіб утримання	індивідуальне	групове
Всього народжених поросят, гол. (M±m)	15,96±0,46	16,01±0,27
В тому числі мертвонароджених, гол.	1,07	1,02
Частка мертвонароджених поросят, %	6,70	6,37
Багатоплідність, гол. (M±m)	14,89±0,33	14,99±0,21
Маса гнізда поросят при народженні, кг (M±m)	20,25±0,67	20,24±0,52
Великоплідність, кг (M±m)	1,36±0,023	1,35±0,019

Таблиця 7

Споживання кормів та виділення молока свиноматкам в індивідуальних і групових системах утримання під час опоросу

Показник	Група свиноматок	
	I (контрольна)	II (дослідна)
Спосіб утримання	індивідуальне	групове
Спожито кому групою свиноматок за період лактації, кг	3706,2	3804,8
Спожито кому на одну свиноматку за період лактації, кг	185,3	190,2
Середньодобове споживання корму свиноматкою, кг	6,39	6,56
Кількість корму спожитого свиноматкою в розрахунку на 1 відлучене порося, кг	13,34	15,15
Кількість спожитого корму на 1 кг приросту поросят, кг	2,36	2,93
Виділення молока за лактацію, кг	388,8	351,6
Середньодобове виділення молока, кг	13,89	12,56
Кількість спожитого корму на виділений 1 л молока, кг	0,48	0,54
Виділено молока на 1 відлучене порося, кг	29,93	27,84
Виділено молока на 1 кг приросту поросят, кг	1,05	1,05

Свиноматки II групи, яких утримували в індивідуальних клітках із вільним виходом до спільної зони, характеризувалися дещо вищим рівнем споживання корму, тоді як за показниками молочної продуктивності певну перевагу мали тварини I групи.

Упродовж лактаційного періоду свиноматки II групи спожили на 98,6 кг корму більше, ніж аналоги I групи, що відповідало збільшенню цього показника на 2,7 %. У розрахунку на одну свиноматку різниця становила 4,93 кг, або 2,7 %, а середньодобове споживання корму було вищим на 0,17 кг. Імовірно, це пов'язано з вищою руховою активністю тварин за альтернативної системи утримання,

оскільки додаткові витрати енергії на пересування та реалізацію природної поведінки потребували більшого надходження поживних речовин.

Разом із тим, підвищене споживання корму не супроводжувалося пропорційним збільшенням молочної продуктивності. Зокрема, витрати корму на одне відлучене порося у свиноматок II групи були більшими на 1,81 кг, або 13,6 %, а на 1 кг приросту живої маси поросят – на 0,57 кг, або 24,2 %, порівняно з тваринами I групи. Це свідчить, що частина додатково спожитої енергії використовувалася не лише на забезпечення лактації, а й на підтримання вищої рухової активності.

За показниками молочної продуктивності перевагу мали свиноматки I групи. Загальна кількість молока, отриманого за період лактації, у них була більшою на 37,2 кг, або 10,6 %, ніж у тварин II групи. Відповідно, середньодобова молочність перевищувала аналогічний показник альтернативної системи утримання на 1,33 кг (10,6 %).

Певні міжгрупові відмінності встановлено й за ефективністю використання корму для синтезу молока. У свиноматок II групи витрати корму на виробництво 1 кг молока були вищими на 0,06 кг, або 12,5 %, що, ймовірно, пов'язано з додатковими енергетичними витратами на пересування та активну поведінку.

У розрахунку на одне відлучене порося свиноматки I групи продукували на 2,09 кг більше молока, що відповідало перевазі близько 7,0 %. Водночас кількість молока, необхідна для утворення 1 кг приросту живої маси поросят, була практично однаковою в обох групах, що свідчить про однакову

біологічну ефективність використання молока молодняком незалежно від технології утримання свиноматок.

Таким чином, утримання свиноматок із можливістю вільного виходу до спільної зони супроводжувалося незначним підвищенням споживання корму (близько 3 %), що було пов'язано зі збільшенням рухової активності та енергетичних витрат. Водночас за цієї технології спостерігалось зниження молочної продуктивності приблизно на 10–11 % та деяке збільшення витрат корму на виробництво молока і приріст поросят. Разом із тим, ефективність використання молока молодняком залишалася однаковою в обох групах, що свідчить про відсутність негативного впливу альтернативної системи утримання на його біологічну цінність.

Аналіз даних **таблиці 8** свідчить, що система утримання певною мірою впливала на продуктивність поросят до відлучення, однак практично не позначалася на інтегральних показниках відтворювальних якостей свиноматок.

Таблиця 8

Продуктивність свиноматок в індивідуальних і групових системах утримання під час відлучення та її комплексна оцінка, $M \pm m$; $n=20$

Показник	I (контрольна група)	II (дослідна група)
Спосіб утримання	індивідуальне утримання	групове утримання
Кількість поросят на свиноматку при відлученні, гол.	12,99±0,271	12,63±0,196
Збереженість поросят в підсисний період, %	87,24	84,26
Маса 1 голови при відлученні, кг	7,01±0,11**	6,52±0,17
Маса гнізда поросят при відлученні, кг	91,1±1,09***	82,4±1,11
ІВЯ, балів	53,87	53,4725
СІВЯС, балів	119,71	117,41

Примітки: збереженість поросят, індекс відтворювальних якостей (ІВЯ) та селекційний індекс відтворювальних якостей свиноматок (СІВЯС) наведено як розрахункові показники. Відмінності між групами за кількістю поросят при відлученні, збереженістю, ІВЯ та СІВЯС статистично незначущі ($p>0,05$). ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$.

Кількість поросят при відлученні у свиноматок I групи була більшою на 0,36 голови, або 2,9 %, порівняно з II групою. Аналогічну закономірність встановлено і за показником збереженості поросят, який у традиційній системі утримання перевищував аналогічний показник альтернативної системи на 2,98 відсоткового пункту (приблизно 3,5 %). Імовірно, це пов'язано з обмеженням рухової активності свиноматок у фіксованих станках, що знижувало ризик випадкового травмування або задавлювання поросят.

Середня жива маса одного поросяти при відлученні також була вищою у свиноматок I групи. Перевага становила 0,49 кг, або 7,5 % ($p<0,01$), що узгоджується з раніше встановленою більшою молочною продуктивністю цих тварин.

Найбільш виражені міжгрупові відмінності виявлено за масою гнізда при відлученні, оскільки цей показник інтегрує чисельність поросят та їхню індивідуальну живу масу. У свиноматок I групи маса гнізда була більшою на 8,7 кг, або 10,6 % ($p<0,001$), що, ймовірно, зумовлено поєднанням вищої молочної продуктивності та кращої збереженості поросят.

Водночас оцінка інтегральних показників відтворювальних якостей не виявила істотної залежності від системи утримання. Значення індексу відтворювальних якостей (ІВЯ) у свиноматок I групи

перевищувало аналогічний показник II групи лише на 0,40 бала (0,7 %), а селекційного індексу відтворювальних якостей свиноматок (СІВЯС) – на 2,30 бала (близько 2,0 %). Отримані результати свідчать про практично однаковий рівень реалізації репродуктивного потенціалу тварин незалежно від застосованої технології утримання.

Таким чином, традиційна система індивідуального утримання забезпечувала дещо вищі показники збереженості та росту поросят до відлучення. Зокрема, середня жива маса одного поросяти була більшою на 7,5 %, а маса гнізда – на 10,6 %, що, ймовірно, пов'язано з вищою молочною продуктивністю свиноматок і меншими енергетичними витратами на рухову активність. Разом із тим, різниця за інтегральними показниками відтворювальних якостей не перевищувала 2 %, що свідчить про збереження високого репродуктивного потенціалу свиноматок за альтернативної системи утримання.

Узагальнення результатів досліджень показало, що утримання підсисних свиноматок в індивідуальних клітках із глибокою піщано-солом'яною підстилкою та вільним виходом до спільної зони істотно покращує їхній поведінковий стан, підвищує рухову активність, практично усуває прояви стереотипної поведінки та забезпечує зростання комплексного

рівня благополуччя. Водночас застосування такої технології не чинить негативного впливу на основні показники відтворної продуктивності під час опоросу, хоча супроводжується певним збільшенням споживання корму, зниженням молочної продуктивності та незначним зменшенням продуктивності поросят до відлучення. Незважаючи на це, інтегральні показники відтворювальних якостей свиноматок залишаються практично однаковими за обох технологій утримання.

Отже, система утримання підсисних свиноматок із вільним виходом до спільної зони є перспективним напрямом удосконалення сучасних технологій свинарства, оскільки забезпечує істотне підвищення рівня благополуччя тварин і реалізацію їхньої природної поведінки без суттєвого зниження репродуктивної ефективності.

Висновки

Запропонована система утримання підсисних свиноматок в індивідуальних клітках із глибокою піщано-солом'яною підстилкою та вільним виходом до спільної зони суттєво покращує поведінкові показники тварин, забезпечуючи підвищення рухової активності, збільшення використання додаткової зони відпочинку та зменшення проявів стереотипної поведінки на 95–98 %.

Альтернативна система сприяє істотному підвищенню рівня благополуччя свиноматок: комплексний індекс благополуччя зріс на 59,6 % (з 24,5 до 39,1 бали), що відповідає категорії «дуже добрий» рівень благополуччя, без негативного впливу на материнську поведінку.

Встановлено, що застосування альтернативної технології не впливає на основні показники репродуктивної продуктивності під час опоросу, оскільки різниця за багатоплідністю, великоплідністю та масою гнізда при народженні не перевищувала 1 %.

Попри дещо нижчу молочну продуктивність і меншу масу гнізда при відлученні, інтегральні показники відтворювальних якостей свиноматок залишалися практично однаковими в обох групах (різниця за ІВЯ становила 0,7 %, за СІВЯС – 2,0 %).

Отримані результати підтверджують, що використання індивідуальних кліток із вільним виходом до спільної зони є перспективним технологічним рішенням для сучасного промислового свинарства, оскільки забезпечує суттєве підвищення рівня благополуччя свиноматок без істотного зниження їхнього репродуктивного потенціалу.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Автори заявляють, що дослідження відповідають нормам гуманного поводження з тваринами та принципам біоетики. Експерименти виконано з

дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Директиви ЄС 2010/63/EU. Під час дослідів для підсисних свиноматок і поросят забезпечували належні зоогігієнічні умови, збалансовану годівлю та постійний доступ до води через автоматичні напувалки. Утримання тварин на глибокій піщано-солом'яній підстилці з вільним виходом до спільної секції розширювало свободу пересування. Оцінювання поведінки здійснювали дистанційно методом цілодобового відеоспостереження, що виключало антропогенне втручання та мінімізувало чинники стресу чи дискомфорту на всіх етапах лактації.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання ІІІ та технологій на основі ІІІ

Автори заявляють, що не використовували штучний інтелект або технології на основі ІІІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. Arellano, P. E., Pijoan, C., Jacobson, L. D., & Algers, B. (1992). Stereotyped behaviour, social interactions and suckling pattern of pigs housed in groups or in single crates. *Applied Animal Behaviour Science*, 35(2), 157–166. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(92\)90006-w](https://doi.org/10.1016/0168-1591(92)90006-w)
2. Barnett, J. L., Hemsworth, P. H., Cronin, G. M., Jongman, E. C., & Hutson, G. D. (2001). A review of the welfare issues for sows and piglets in relation to housing. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52(1), 1–28. <https://doi.org/10.1071/ar00057>
3. Baxter, E. M., Bowers, N., King, R., Brocklehurst, S., & Edwards, S. A. (2024). Factors contributing to high performance of sows in free farrowing systems. *Porcine Health Management*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s40813-024-00366-w>
4. Baxter, E. M., Lawrence, A. B., & Edwards, S. A. (2012). Alternative farrowing accommodation: welfare and economic aspects of existing farrowing and lactation systems for pigs. *Animal*, 6(1), 96–117. <https://doi.org/10.1017/s1751731111001224>
5. Baxter, E. M., Moustsen, V. A., Goumon, S., Illmann, G., & Edwards, S. A. (2022). Transitioning from crates to free farrowing: A roadmap to navigate key decisions. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 998192. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.998192>
6. Bonde, M., Rousing, T., Badsberg, J. H., & Sørensen, J. T. (2004). Associations between lying-down behaviour problems and body condition, limb disorders and skin lesions of lactating sows housed in farrowing crates in commercial sow herds. *Livestock Production Science*, 87(2-3), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2003.08.005>
7. Broom, D. M. (1986). Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*, 142(6), 524–526. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(86\)90109-0](https://doi.org/10.1016/0007-1935(86)90109-0)
8. Ceballos, M. C., Rocha Góis, K. C., Parsons, T. D., & Pierdon, M. (2021). Impact of duration of farrowing crate closure on physical indicators of sow welfare and piglet mortality. *Animals*, 11(4), 969. <https://doi.org/10.3390/ani11040969>

9. Chantzias, I., Dewulf, J., Van Limbergen, T., Klinkenberg, M., Palzer, A., Pineiro, C., Aarestrup Moustsen, V., Niemi, J., Kyriazakis, I., & Maes, D. (2018). Factors associated with specific health, welfare and reproductive performance indicators in pig herds from five EU countries. *Preventive Veterinary Medicine*, 159, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.09.006>
10. Cheon, S. N., Jeong, S. H., Yoo, G. Z., Lim, S. J., Kim, C. H., Jang, G. W., & Jeon, J. H. (2022). Effect of alternative farrowing pens with temporary crating on the performance of lactating sows and their litters. *Journal of Animal Science and Technology*, 64(3), 574–587. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e36>
11. Chidgey, K. L., Morel, P. C. H., Stafford, K. J., & Barugh, I. W. (2016). Observations of sows and piglets housed in farrowing pens with temporary crating or farrowing crates on a commercial farm. *Applied Animal Behaviour Science*, 176, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.01.004>
12. Chidgey, K. L., Udomteerasuwat, N., Morel, P. C. H., & Castillo-Alcala, F. (2022). Animal welfare compromises associated with causes of death in neonatal piglets. *Animals*, 12(21), 2933. <https://doi.org/10.3390/ani12212933>
13. Condous, P. C., Plush, K. J., Tilbrook, A. J., & van Wettere, W. H. E. J. (2016). Reducing sow confinement during farrowing and in early lactation increases piglet mortality. *Journal of Animal Science*, 94(7), 3022–3029. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0145>
14. Courboulay, V., & Boulot, S. (2025). 4. Impacts of three types of farrowing pens (crate, temporary confinement, lift crate and temporary confinement) on the performance and behaviour of sows and piglets. *Animal - Science Proceedings*, 16(6), 852–853. <https://doi.org/10.1016/j.anscip.2025.08.005>
15. Dalmau, A., Velarde, A., Scott, K., Edwards, S., Veissier, I., Keeling, L., Butterworth, A., van Overbeke, G., & Bedaux, V. (2009). *Welfare Quality assessment protocol for pigs (sows and piglets, growing and finishing pigs)*. Welfare Quality Consortium.
16. Dawkins, M. (2004). Using behaviour to assess animal welfare. *Animal Welfare*, 13(S1), S3–S7. <https://doi.org/10.1017/s0962728600014317>
17. Dumniem, N., Boonprakob, R., Parsons, T. D., & Tummaruk, P. (2023). Pen versus crate: A comparative study on the effects of different farrowing systems on farrowing performance, colostrum yield and piglet preweaning mortality in sows under tropical conditions. *Animals*, 13(2), 233. <https://doi.org/10.3390/ani13020233>
18. Nielsen, S. S., Alvarez, J., Bicout, D. J., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J. A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J. L., Schmidt, G., Herskin, M., Michel, V., Miranda Chueca, M. A., Mosbach-Schulz, O., Padalino, B., Roberts, H. C., Stahl, K., Velarde, A., Viltrop, A., Winckler, C., Edwards, S., Ivanova, S., Leeb, C., Wechsler, B., Fabris, C., Lima, E., Mosbach-Schulz, O., Van der Stede, Y., Vitali, M., & Spooler, H. (2022). Welfare of pigs on farm. *EFSA Journal*, 20(8), e07421. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7421>
19. Einarsson, S., Sjunnesson, Y., Hultén, F., Eliasson-Selling, L., Dalin, A.-M., Lundeheim, N., & Magnusson, U. (2014). A 25 years experience of group-housed sows–reproduction in animal welfare-friendly systems. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-56-37>
20. Ferreira, A. S., Costa, P. M. A., Pereira, J. A. A., & Gomes, J. C. (1988). Estimativa de produção de leite de porca. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 17(3), 203–211.
21. Glencorse, D., Plush, K., Hazel, S., D'Souza, D., & Hebart, M. (2019). Impact of non-confinement accommodation on farrowing performance: A systematic review and meta-analysis of farrowing crates versus pens. *Animals*, 9(11), 957. <https://doi.org/10.3390/ani9110957>
22. Goumon, S., Illmann, G., Moustsen, V. A., Baxter, E. M., & Edwards, S. A. (2022). Review of temporary crating of farrowing and lactating sows. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 811810. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.811810>
23. Hales, J., Moustsen, V. A., Nielsen, M. B. F., & Hansen, C. F. (2014). Higher preweaning mortality in free farrowing pens compared with farrowing crates in three commercial pig farms. *Animal*, 8(1), 113–120. <https://doi.org/10.1017/s1751731113001869>
24. Ibach, S., Chou, J.-Y., Battini, M., & Parsons, T. D. (2024). A systematic approach to defining and verifying descriptors used in the qualitative behavioral assessment of sows. *Animal Welfare*, 33, e8. <https://doi.org/10.1017/awf.2024.6>
25. Kinane, O., Butler, F., & O'Driscoll, K. (2022). Freedom to move: Free lactation pens improve sow welfare. *Animals*, 12(14), 1762. <https://doi.org/10.3390/ani12141762>
26. Kim, J. H., Ni, J.-Q., Ogundare, W., Schinckel, A. P., Minor, R. C., Johnson, J. S., & Casey, T. M. (2025). Sow and piglet behavior characterization using visual observation, sensor detection, and video recording. *Applied Sciences*, 15(6), 3018. <https://doi.org/10.3390/app15063018>
27. Kramarenko, S. S., Luhovyi, S. I., Lykhach, A. V., & Kramarenko, O. S. (2019). *Analiz biometrychnykh danykh u rozvedenni ta selektsii tvaryn* [Analysis of biometric data in animal breeding and selection: A textbook]. Mykolaiv National Agrarian University. (in Ukrainian)
28. Krempa, N. Yu., Kozenko, O. V., Gutyj, B. V., Dvyluk, I. V., Magrelo, N. V., Klym, H. V., Martysuk, T. V., Vus, U. M., & Vysotskyi, A. O. (2024). Assessment of the level of welfare under modern pig-keeping technologies, taking into account their ethological needs and characteristics. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 26(116), 284–291. <https://doi.org/10.32718/nvltvet11641>
29. Loftus, L., Bell, G., Padmore, E., Atkinson, S., Henworth, A., & Hoyle, M. (2020). The effect of two different farrowing systems on sow behaviour, and piglet behaviour, mortality and growth. *Applied Animal Behaviour Science*, 232, 105102. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.105102>
30. Marchant-Forde, J. N. (Ed.). (2009). *The welfare of pigs*. Springer Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8909-1>
31. Min, Y., Choi, Y., Kim, J., Kim, D., Jeong, Y., Kim, Y., Song, M., & Jung, H. (2020). Comparison of the Productivity of primiparous sows housed in individual stalls and group housing systems. *Animals*, 10(11), 1940. <https://doi.org/10.3390/ani10111940>
32. Moustsen, V. A., Seddon, Y. M., & Hansen, M. J. (2023). Animal board invited review: The need to consider emissions, economics and pig welfare in the transition from farrowing crates to pens with loose lactating sows. *Animal*, 17(9), 100913. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100913>
33. Nicolaisen, T., Lühken, E., Volkmann, N., Rohn, K., Kemper, N., & Fels, M. (2019). The effect of sows' and piglets' behaviour on piglet crushing patterns in two different farrowing pen systems. *Animals*, 9(8), 538. <https://doi.org/10.3390/ani9080538>
34. Olsson, A.-C., Botermans, J., & Englund, J.-E. (2018). Piglet mortality – A parallel comparison between loose-housed and temporarily confined farrowing sows in the same herd. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science*, 68(1), 52–62. <https://doi.org/10.1080/09064702.2018.1561934>
35. Ott, S., Moons, C. P. H., Kashiha, M. A., Bahr, C., Tuytens, F. A. M., Berckmans, D., & Niewold, T. A. (2014). Automated video analysis of pig activity at pen level highly correlates to human observations of behavioural activities. *Livestock Science*, 160, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.12.011>
36. Payne, H. G., Moore, K. L., Gardiner, A., Gardiner, A. J., Gardiner, R., Loudon, E., & Cronin, G. M. (2009). Piglet survival in farrowing pens in a hoop structure versus in farrowing crates in an environmentally controlled building. In *Manipulating pig production XII* (p. 138). Australasian Pig Science Association. https://library.dpird.wa.gov.au/conf_papers/239
37. Povod, M. H., Lykhach, V. Ya., Lykhach, A. V., & Oboronko, D. M. (2022). *Praktychna realizatsiia isnuuichykh ta udoskonalenykh tekhnolohii vyrobnytstva produktii svynarstva* [Practical implementation of existing and improved technologies for pig production: A monograph]. Ilion. (in Ukrainian)
38. Seddon, Y. M., & Moustsen, V. A. (2023). 64. The farrowing environment sets the conditions for sow and piglet productivity as well as their welfare. *Animal - Science Proceedings*, 14(6), 787–792. <https://doi.org/10.1016/j.anscip.2023.08.065>
39. Sossidou, E. N., Banias, G. F., Batsioulas, M., Termatzidou, S.-A., Simitzi, P., Patsios, S. I., & Broom, D. M. (2025). Modern pig production: Aspects of animal welfare, sustainability and circular bioeconomy. *Sustainability*, 17(11), 5184. <https://doi.org/10.3390/su17115184>

40. Tsereniuk, O. M., Khvatov, A. I., & Stryzhak, T. A. (2010). Otsinka efektyvnosti indeksiv materynskoï produktyvnosti svynei [Evaluation of the effectiveness of maternal productivity indices of pigs]. *Zbirnyk Naukovykh Prats Vinnytskoho Natsionalnoho Ahrarnoho Universytetu. Serii: Tvarynnytstvo*, 3(42), 73–77. (in Ukrainian)
41. Vandresen, B., & Hötzel, M. J. (2021). “Mothers should have freedom of movement” — citizens’ attitudes regarding farrowing housing systems for sows and their piglets. *Animals*, 11(12), 3439. <https://doi.org/10.3390/ani11123439>
42. Pitts, A. D., Weary, D. M., Fraser, D., Pajor, E. A., & Kramer, D. L. (2002). Alternative housing for sows and litters. *Applied Animal Behaviour Science*, 76(4), 291–306. [https://doi.org/10.1016/s0168-1591\(02\)00012-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1591(02)00012-6)
43. Yun, J., Swan, K.-M., Farmer, C., Oliviero, C., Peltoniemi, O., & Valros, A. (2014). Parturition nest-building has an impact on postpartum nursing performance and maternal behaviour in early lactating sows. *Applied Animal Behaviour Science*, 160, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.08.011>
44. Hlukhenkyi, S. L., & Lykhach, V. Ya. (2024). Productivity of sows with the design features of machine equipment in farrowing shop. *Taurian Scientific Herald*, 140, 406–418. <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2024.140.49>
45. Ladyka, V. I., Khmelnychiy, L. M., & Povod, M. H. (2023). *Tekhnolohiia vyrobnytstva i pererobky produktiv tvarynnytstva: Pidruchnyk dlia aspirantiv* [Technology of production and processing of livestock products: A textbook for postgraduate students]. Oldi+. (in Ukrainian)

ORCID

D. Prytyka		https://orcid.org/0009-0001-6912-0778
Y. Dereza		https://orcid.org/0000-0001-9851-252X
A. Shostia		https://orcid.org/0000-0002-1475-2364
S. Usenko		https://orcid.org/0000-0001-9263-5625
L. Kuzmenko		https://orcid.org/0000-0002-1776-0714
V. Slynko		https://orcid.org/0000-0002-1673-5840
O. Izhboldina		https://orcid.org/0000-0002-8816-2228
O. Makhovyi		https://orcid.org/0009-0006-2044-484X
V. Morozov		https://orcid.org/0009-0002-1741-8836
S. Korsakov		https://orcid.org/0009-0008-5172-9930
V. Prunenko		https://orcid.org/0009-0000-3162-3188



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Laboratory diagnosis of chronic kidney disease in dogs

N. Kanivets[✉] | T. Burda | S. Zarytskyi | L. Karysheva | K. Suprunenko

Article info

Correspondence Author

N. Kanivets

E-mail:

nataliia.kanivets@pdau.edu.uaPoltava State Agrarian
University,
Skovoroda Str., 1/3,
Poltava, 36000, Ukraine**Citation:** Kanivets, N., Burda, T., Zarytskyi, S., Karysheva, L., & Suprunenko, K. (2026). Laboratory diagnosis of chronic kidney disease in dogs. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 48–53. doi: 10.31210/spi2026.29.02.07

The study was conducted on dogs with confirmed chronic kidney disease, as determined by clinical examination, hematological and biochemical blood tests, and laboratory urine analysis. It was found that the progression of the disease is accompanied by significant abnormalities in blood and urine parameters, which worsen in accordance with the degree of renal tissue damage. In stage III of the disease, dogs exhibited a decrease in red blood cell count ($P < 0.01$), hemoglobin concentration ($P < 0.001$), hematocrit ($P < 0.001$), and platelet count ($P < 0.001$), indicating the development of anemic syndrome. At the same time, an increase in white blood cell count ($P < 0.001$) and a decrease in the percentage of lymphocytes ($P < 0.05$) were observed, indicating the presence of concomitant inflammatory processes and immunological disorders. Biochemical tests revealed a decrease in albumin levels ($P < 0.01$), a significant increase in the levels of symmetric dimethylarginine ($P < 0.001$), urea ($P < 0.001$), creatinine ($P < 0.001$), and inorganic phosphorus ($P < 0.001$), which characterized impaired renal filtration capacity and the accumulation of nitrogenous waste products. Urinalysis in dogs with stage III disease revealed a decrease in specific gravity ($P < 0.001$), the presence of protein ($P < 0.001$), and an increase in the number of leukocytes in the sediment. In stage IV chronic kidney disease, all of these changes were more pronounced. In dogs with stage IV CKD, severe anemia, pronounced thrombocytopenia, and lymphocytopenia were observed against a background of leukocytosis. The concentrations of markers characterizing renal function were several times higher compared to clinically healthy animals, indicating significant impairment or loss of renal excretory function. The development of hypoproteinemia and hypoalbuminemia was observed, which is associated with progressive damage to the nephrons and protein loss. Urine samples were characterized by a sharp decrease in specific gravity, marked proteinuria, an increase in white blood cell count, and, in some cases, anuria. The results confirm that a comprehensive assessment of blood and urine parameters is a useful approach for evaluating renal function, determining the stage of the pathological process, monitoring disease progression, and predicting its outcomes in dogs with chronic kidney disease.

Keywords: veterinary diagnostics, blood biochemistry, urinalysis, proteins, urea, creatinine, symmetric dimethylarginine.

Лабораторна діагностика хронічної хвороби нирок у свійських собак

Н. С. Канівець | Т. Л. Бурда | С. М. Зарицький | Л. П. Каришева | К. В. Супруненко

Полтавський державний
аграрний університет,
м. Полтава, Україна

Дослідження проведено на собаках із підтвердженою хронічною хворобою нирок шляхом клінічного обстеження, гематологічного, біохімічного аналізу крові та лабораторного дослідження сечі. Встановлено, що розвиток захворювання супроводжується суттєвими порушеннями показників крові та сечі, які прогресують відповідно до ступеня ураження ниркової тканини. На III стадії захворювання у собак виявлено зниження кількості еритроцитів ($P < 0,01$), вмісту гемоглобіну ($P < 0,001$), величини гематокриту ($P < 0,001$) та кількості тромбоцитів ($P < 0,001$), що свідчило про розвиток анемічного синдрому. Одночасно реєстрували підвищення кількості лейкоцитів ($P < 0,001$) та зменшення частки лімфоцитів ($P < 0,05$), що вказувало на наявність супутніх запальних процесів та імунологічних порушень. Біохімічними дослідженнями встановлено зниження вмісту альбумінів ($P < 0,01$), значне підвищення вмісту симетричного диметиларгініну ($P < 0,001$), сечовини ($P < 0,001$), креатиніну ($P < 0,001$) та неорганічного фосфору ($P < 0,001$), що характеризувало порушення фільтраційної здатності нирок і накопичення продуктів азотистого обміну. Під час дослідження сечі у собак на III стадії захворювання виявлено зниження її відносної густини ($P < 0,001$), появу протеїну ($P < 0,001$) та збільшення кількості лейкоцитів в осаді. На четвертій стадії хронічної хвороби нирок усі виявлені зміни були більш вираженими. У собак на IV стадії ХХН реєстрували тяжку анемію, виражену тромбоцитопенію та лімфоцитопенію на тлі лейкоцитозу. Концентрація показників, що характеризують функціональний стан нирок, зростала у декілька разів порівняно з показниками клінічно здорових тварин, що свідчило про значне пригнічення або втрату екскреторної функції нирок. Встановлено розвиток гіпопротеїнемії та гіпоальбумінемії, що пов'язано з прогресуючим ушкодженням нефронів і втратою білків. Для сечі були характерними різке зниження відносної густини, виражена протеїнурія, збільшення кількості лейкоцитів та, в окремих випадках, анурія. Отримані результати підтверджують, що комплексне визначення показників крові та сечі є інформативним підходом для оцінки функціонального стану нирок, визначення стадії патологічного процесу, моніторингу перебігу захворювання та прогнозування його наслідків у собак із хронічною хворобою нирок.

Ключові слова: діагностика хвороб тварин, біохімія крові, дослідження сечі, протеїни, сечовина, креатинін, симетричний диметиларгінін.**Бібліографічний опис для цитування:** Канівець Н. С., Бурда Т. Л., Зарицький С. М., Каришева Л. П., Супруненко К. В. Лабораторна діагностика хронічної хвороби нирок у свійських собак. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 48–53.

Вступ

Захворювання нирок, зокрема хронічна хвороба нирок (ХХН) – це стан, за якого розвиваються функціональні та морфологічні зміни органу, які тривають понад три місяці. Хронічні захворювання нирок часто діагностують у дрібних тварин (собак, котів) [27]. Існують повідомлення, що хронічна хвороба нирок у свійських собак досить поширена та у віці понад 10 років становить близько 15 % [8, 10]. Згідно з рекомендаціями International Renal Interest Society (IRIS) у ветеринарній практиці хронічні хвороби нирок класифікують за стадіями [33].

Система класифікації хвороб нирок у собак базується на визначенні в крові вмісту креатиніну та симетричного диметиларгініну (СДМА) й додатково враховує показники системного артеріального тиску та протеїнурії, які допомагають оцінити тяжкість захворювання й прогноз життя [17]. Проте смертність від захворювань нирок у собак залишається високою, що пов'язано з пізнім встановленням діагнозу та нечутливістю діагностичних тестів [8].

Відомо, що нирки беруть участь у виробленні гормону еритропоєтину, який впливає на утворення еритроцитів [34]. За руйнування структури нирки вироблення еритропоєтину зменшується, що провокує розвиток анемії [1]. Водночас, окрім зниження еритропоезу, уремія, що розвивається внаслідок прогресуючого захворювання нирок, може знизити виживання еритроцитів [6].

Зважаючи на доступну інформацію, актуальність проблеми хронічної хвороби нирок у свійських собак зумовлена необхідністю своєчасної діагностики та моніторингу функціонального стану нирок.

Дана робота проведена задля аналізу змін крові і сечі свійських собак за ХХН на різних стадіях її розвитку.

Мета дослідження

Мета дослідження – охарактеризувати окремі гематологічні й біохімічні показники крові, зміни сечі у свійських собак на III–IV стадіях хронічної хвороби нирок.

Завдання – оцінити зміни показників лабораторного дослідження біологічних рідин собак (кров, сеча) за ХХН на III та IV стадіях і описати їх діагностичне значення для визначення тяжкості перебігу захворювання.

Таблиця 1

Окремі гематологічні показники за хронічної хвороби нирок у свійських собак, $M \pm m$, $n=7$

Показник	Клінічно здорові	III стадія	IV стадія
Еритроцити (RBC), Т/л	$6,8 \pm 0,37$	$4,8 \pm 0,41^{**}$	$3,7 \pm 0,35^{***}$
Гемоглобін (Hb), г/л	$148,1 \pm 7,4$	$98,9 \pm 3,36^{***}$	$75,5 \pm 2,37^{***}$
Гематокрит (HCT), %	$46,0 \pm 2,44$	$32,4 \pm 1,0^{***}$	$17,6 \pm 0,72^{***}$
Лейкоцити (WBC), Г/л	$11,2 \pm 1,22$	$20,4 \pm 1,01^{***}$	$17,9 \pm 0,78^{***}$
Лімфоцити (LYM), %	$20,8 \pm 2,6$	$11,7 \pm 1,73^*$	$8,6 \pm 0,99^{***}$
Тромбоцити (PLT), Г/л	$391,6 \pm 34,25$	$255,5 \pm 7,27^{***}$	$191,4 \pm 6,69^{***}$

Примітки: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ порівняно з клінічно здоровими тваринами.

У хворих собак на III стадії хронічної хвороби нирок відмічали зменшення кількості еритроцитів (RBC) у 1,4 рази ($P < 0,01$) та тромбоцитів (PLT) у

Матеріали і методи

Дослідження проводили на базі ветеринарних клінік м. Полтава у період 2022–2026 років. Об'єкт дослідження – свійські собаки із діагностованою хронічною хворобою нирок III ($n=7$) та IV ($n=7$) стадій. Стадію захворювання визначали за результатами клінічного обстеження та лабораторних досліджень відповідно до сучасних критеріїв оцінки функціонального стану нирок, зокрема IRIS (International Renal Interest Society). Контрольна група – клінічно здорові собаки ($n=7$) – підібрані за методом аналогів. У всіх тварин проводили клінічний огляд із оцінкою загального стану організму.

Для аналізу гематологічних показників відбирали кров із периферичних вен тварин (*v. Saphena*). У крові визначали кількість еритроцитів (RBC), лейкоцитів (WBC), тромбоцитів (PLT), вміст гемоглобіну (Hb), величину гематокриту (HCT) та частку лімфоцитів (LYM) на гематологічному аналізаторі BC-30s Mindray (Китай). Біохімічними методами у сироватці крові визначали вміст загального протеїну (TP), альбумінів (ALB), симетричного диметиларгініну (SDMA), сечовини (UREA), креатиніну (CREA), неорганічного фосфору (PHOS) та загального кальцію (Ca) на біохімічному аналізаторі SMT-120 (Китай). Для оцінки функціонального стану нирок досліджували фізичні та хімічні властивості сечі, зокрема колір, запах, прозорість, відносну густину, реакцію середовища (pH), наявність протеїну, глюкози, кетонів тіл, а також проводили мікроскопію осаду сечі з підрахунком лейкоцитів.

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з визначенням середнього арифметичного значення та його похибки. Вірогідність відмінностей між показниками клінічно здорових і хворих тварин вважали статистично значущою за рівня ймовірності $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У проведеному дослідженні хронічну хворобу нирок у свійських собак було діагностовано на III та IV стадіях, що характеризувалось змінами гематологічних показників (*табл. 1*).

1,5 рази ($P < 0,001$) порівняно з клінічно здоровими тваринами. Водночас у цих тварин реєстрували зменшення величини гематокриту (HCT) у 1,4 рази

($P<0,001$) та вмісту гемоглобіну (Hb) – 1,5 рази ($P<0,001$), що вказує на розвиток анемії. За даними IRIS (International Renal Interest Society) анемія у собак за хронічної хвороби нирок обумовлена втраченою функціональністю нирок, оскільки за розвитку ХХН нирки втрачають здатність до вироблення гормону еритропоєтину, який є стимулятором кісткового мозку до вироблення червоних кров'яних тілець [2, 21]. Щодо зниження тромбоцитів, то у пацієнтів на III стадії ХХН розвивається накопичення в крові продуктів розпаду протеїнів (уремія), які часто спричиняють руйнування/ушкодження судин (васкуліт) або мікроангіопатію (внаслідок високого тиску (гіпертензії) та дії токсинів). Захисною реакцією організму є активація тромбоцитів у місцях ушкодження задля відновлення судин дрібного калібру, що провокує зниження їхньої кількості та навіть виснаження [12, 16, 20].

Водночас у собак на III стадії ХХН виявили підвищення кількості лейкоцитів (WBC) у 1,8 рази ($P<0,001$) та зменшення частки лімфоцитів (LYM) у 1,8 рази ($P<0,05$) порівняно з клінічно здоровими тваринами, що характеризує розвиток супутньої запальної реакції, ймовірно, на тлі інфекції. Виражений лімфоцитоз у хворих тварин за III стадії ХХН пов'язаний з імуносупресією, що викликає зменшення кількості В- і Т-лімфоцитів [22]. Розвиток

хронічної хвороби нирок у собак викликає окислювальний стрес, підвищення ендogenousного кортизолу (гормону стресу), перерозподіл лімфоцитів у крові, які мігрують в лімфатичні вузли та селезінку [18, 26]. Зниження функціональної активності нирок призводить до дисбалансу окисно-відновних процесів, атрофії каналців, гломерулосклерозу та провокує серцево-судинні ускладнення [30, 32].

У собак за IV стадії ХХН встановили виражену анемію: зниження RBC у 1,8 рази ($P<0,001$), PLT – 2 рази ($P<0,001$), вмісту Hb – 1,9 рази ($P<0,001$), величини HCT – 2,7 рази ($P<0,001$), та зміни лейкоцитарної формули, зокрема зниження частки лімфоцитів у 2,6 рази ($P<0,001$) порівняно з показниками клінічно здорових тварин. Лімфоцитопенію реєстрували на тлі лейкоцитозу ($P<0,001$), що свідчить про розвиток супутніх запальних реакцій. Прогресування анемії у собак на IV стадії ХХН обумовлено не лише зменшенням виділення еритропоєтину нирками, а й появою шлунково-кишкових кровотеч та інтоксикації організму, що узгоджується з результатами інших науковців [21] та з дослідженнями гуманної медицини [5, 14].

З метою оцінки функціональної активності нирок у собак за хронічної хвороби нирок додатково провели біохімічне дослідження сироватки крові (табл. 2).

Таблиця 2

Окремі біохімічні показники сироватки крові свійських собак за хронічної хвороби нирок, $M\pm m$, $n=7$

Показник	Клінічно здорові тварини	III стадія	IV стадія
Загальний протеїн (TP), г/л	63,0 $\pm$ 2,67	61,5 $\pm$ 2,10	54,8 $\pm$ 1,10*
Альбуміни (ALB), г/л	29,0 $\pm$ 0,71	23,2 $\pm$ 1,53**	19,7 $\pm$ 0,75***
СДМА (SDMA), мкг/дл	6,5 $\pm$ 1,23	37,3 $\pm$ 1,6***	59,1 $\pm$ 2,38***
Сечовина (UREA), ммоль/л	5,9 $\pm$ 0,5	23,8 $\pm$ 2,71***	56,0 $\pm$ 5,32***
Креатинін (CREA), мкмоль/л	77,1 $\pm$ 8,03	332,4 $\pm$ 29,52***	748,7 $\pm$ 89,27***
Неорганічний Фосфор (PHOS), ммоль/л	1,3 $\pm$ 0,15	2,2 $\pm$ 0,13***	4,3 $\pm$ 0,5***
Загальний Кальцій (Ca), ммоль/л	2,7 $\pm$ 0,11	2,3 $\pm$ 0,14	2,6 $\pm$ 0,1

Примітки: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ – порівняно з клінічно здоровими тваринами.

У свійських собак на III стадії ХХН вміст загального протеїну (TP) реєстрували в межах норми (61,5 $\pm$ 2,10 г/л). Проте вміст альбумінів (ALB) був на 20 % нижчим ($P<0,01$) за показник клінічно здорових тварин. Такі зміни на III стадії ХХН у собак пов'язані з гломерулопатією (втратою протеїнів з сечею внаслідок ураження/ушкодження нефронів), уремичною інтоксикацією (пригнічення синтезу альбумінів гепатоцитами на тлі ураження печінки), розладами травлення (уремічний гастрит, який провокує втрату альбумінів через запалення слизової оболонки шлунка та кишечника) [4, 23, 28]. Вміст симетричного диметиларгініну (SDMA) в сироватці крові собак на III стадії ХХН реєстрували у 5,7 раз вище ($P<0,001$) за показник клінічно здорових тварин. За даними IRIS на III стадії ХХН понад 70 % нефронів гинуть та заміщуються рубцевою тканиною, тому симетричний диметиларгінін накопичується в крові, оскільки нирки втрачають фільтраційну активність [19, 24, 31]. Водночас у собак на III стадії ХХН відмічали високий вміст сечовини та креатиніну порівняно з клінічно здоровими тваринами у 4,0 та 4,3 рази ($P<0,001$) відповідно. Наші результати узгоджуються із

показниками інших дослідників, оскільки за розвитку хронічної хвороби нирок у свійських собак затримуються продукти розпаду протеїнів у крові [3, 7, 35]. Щодо мінерального складу крові, то у хворих тварин на III стадії ХХН встановили підвищення вмісту неорганічного фосфору (PHOS) у 1,7 рази ($P<0,001$), у той час як рівень загального кальцію (Ca) не виходив за межі норми. Зниження швидкості клубочкової фільтрації призводить до накопичення фосфору в крові, водночас надлишок фосфору знижує вміст вільного кальцію крові, що провокує підвищення утворення і виділення паратиреоїдного гормону (ПТГ), який вивільняє кальцій та фосфор із кісток, підвищуючи і так високий рівень останнього [13, 25].

На IV стадії ХХН у свійських собак реєстрували зниження TP на 13 % ($P<0,05$), ALB – на 32,1 % ($P<0,001$) порівняно з показниками клінічно здорових тварин. За даними інших дослідників, гіпопротеїнемія/гіпоальбумінемія у собак на IV стадії ХХН зумовлена значною втратою протеїнів разом із сечею внаслідок ушкодження нефронів, зменшенням надходження їх із кормів (анорексія, блювання) на тлі уремичної інтоксикації [3, 29].

У хворих собак на IV стадії ХХН відмічали значні, часто незворотні розлади фільтраційної здатності нирок: високий вміст в сироватці крові SDMA у 9,0 рази ($P<0,001$), UREA – у 9,5 рази ($P<0,001$), CREA – у 9,7 рази ($P<0,001$) порівняно з показниками клінічно здорових собак. Високий вміст неорганічного фосфору (PHOS) у 3,3 рази підтверджує руйнування нирок та зниження і навіть втрату їх фільтраційної активності. Отримані результати біохімічних досліджень крові собак на IV стадії ХХН вказують на термінальний стан, що, на жаль, навіть за наявності лікування призвело до їхньої загибелі. Існують повідомлення, що високі показники вмісту сечовини, креатиніну, СДМА, фосфору є

наслідком порушення екскреторної функції нирок, провокують уремичне отруєння та ведуть до летального наслідку [17, 19].

У собак на III стадії ХХН відмічали зміни показників сечі (*табл. 3*). У більшості тварин сеча мала світло-жовтий колір, слабо специфічний запах, відносна густина була нижчою ($P<0,001$) за показник клінічно здорових тварин, наявний протеїн ($P<0,001$), в осаді реєстрували лейкоцити. Зниження відносної густини сечі у собак на III стадії ХХН підтверджує результати змін біохімічних показників і вказує на втрату здатності нирок концентрувати сечу, а протеїн, який з'являється в сечі, пришвидшує руйнування нефронів [9, 15].

Таблиця 3

Результати лабораторного дослідження сечі собак за хронічної хвороби нирок, $n=7$

Показник	Клінічно здорові тварини	III стадія ХХН	IV стадія ХХН
Колір	жовтий	світло-жовтий	блід-жовтий
Запах	специфічний	слабо специфічний	відсутній
Консистенція	водяниста	водяниста	водяниста
Прозорість	прозора	прозора	прозора
Відносна густина, $M\pm m$	$1,033\pm 0,003$	$1,019\pm 0,001^{***}$	$1,012\pm 0,001^{***}$
pH, $M\pm m$	$6,6\pm 0,07$	$6,2\pm 0,9$	$6,1\pm 0,9$
Протеїни, г/л, $M\pm m$	відсутній	$0,04\pm 0,0^{***}$	$0,65\pm 0,04^{***}$
Глюкоза, ммоль/л	відсутня	відсутня	відсутня
Кетони, ммоль/л	відсутні	відсутні	відсутні
Лейкоцити, шт. у п.з.	до 2	3–5	7–14

Примітка: $***P<0,001$ порівняно з показниками клінічно здорових тварин.

У собак на IV стадії ХХН зміни в сечі були більш вираженими, зокрема, занадто знизилася відносна густина ($P<0,001$), збільшився вміст протеїнів ($P<0,001$) та лейкоцитів. Внаслідок зменшення концентрації сечі її колір набув світло-жовтого/водянистого відтінку. У окремих випадках у тварин спостерігали анурію. Нирки собак за ХХН на IV стадії повністю втрачають здатність виводити продукти обміну протеїнів, розвиваються інтоксикація, зневоднення, блювання, гіпертензія, відносна густина відповідає показникам первинної сечі [11, 15].

Отримані результати свідчать, що у свійських собак хронічна хвороба нирок прогресує залежно від стадії та супроводжується погіршенням показників крові й сечі. Найбільш виражені зміни встановили на IV стадії захворювання, які характеризувались тяжкою анемією, значним порушенням екскреторної та концентраційної функцій нирок, розвитком уремичної інтоксикації та несприятливим прогнозом.

Висновки

У свійських собак із хронічною хворобою нирок на III–IV стадіях встановлено зміни гематологічних показників (анемія, тромбоцитопенія, лейкоцитоз, лімфоцитопенія), які погіршувалися зі зростанням стадії захворювання. Біохімічні дослідження сироватки крові підтвердили істотне зниження функціональної активності нирок, що проявлялося підвищенням концентрацій SDMA, сечовини, креатиніну та неорганічного фосфору, а також розвитком гіпоальбумінемії. Дослідження сечі показало зниження її відносної густини, появу протеїнуриї та збільшення кількості лейкоцитів в осаді, що вказує на

втрату концентраційної здатності нирок і прогресує ушкодження нефронів.

Перспективи подальших досліджень полягають в ультрасонографії нирок собак на різних стадіях ХХН.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Автори заявляють, що всі проведені дослідження повністю відповідають загальноприйнятим нормам гуманного ставлення до тварин та принципам біоетики. Клінічна частина роботи виконувалася з суворим дотриманням вимог чинного законодавства України, зокрема Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», а також Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту та Ради від 22 вересня 2010 року про захист тварин, що використовуються для наукових цілей. Усі діагностичні маніпуляції та процедури проводилися виключно після отримання офіційної інформованої згоди від власників тварин на участь у дослідженні. Під час виконання роботи хворим собакам забезпечувалися належні умови утримання, якісний догляд, збалансована годівля, а також повна мінімізація будь-яких стресових, больових чи дискомфортних факторів.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки
Немає.

Декларація щодо використання ШІ та технологій на основі ШІ

Автори заявляють, що не використовували штучний інтелект або технології на основі ШІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. Badura, K., Janc, J., Wąsik, J., Gnitecki, S., Skwira, S., Młynarska, E., Rysz, J., & Franczyk, B. (2024). Anemia of chronic kidney disease – A narrative review of its pathophysiology, diagnosis, and management. *Biomedicines*, 12(6), 1191. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061191>
2. Borin-Crivellenti, S., Crivellenti, L. Z., Gilor, C., Gilor, S., Silva, D. G., Maia, S. R., Costa, P. B., Alvarenga, A. W. O., Fernandes, A. L. S., & Santana, A. E. (2023). Anemia in canine chronic kidney disease is multifactorial and associated with decreased erythroid precursor cells, gastrointestinal bleeding, and systemic inflammation. *American Journal of Veterinary Research*, 84(10), 1–6. <https://doi.org/10.2460/ajvr.23.05.0097>
3. Brunetto, M. A., Ruberti, B., Halfen, D. P., Caragelasco, D. S., Vendramini, T. H. A., Pedrinelli, V., Macedo, H. T., Jeremias, J. T., Pontieri, C. F. F., Ocampos, F. M. M., Colnago, L. A., & Kogika, M. M. (2021). Healthy and Chronic kidney disease (CKD) dogs have differences in serum metabolomics and renal diet may have slowed disease progression. *Metabolites*, 11(11), 782. <https://doi.org/10.3390/metabo11110782>
4. Butt, L., Unnersjö-Jess, D., Höhne, M., Edwards, A., Binz-Lotter, J., Reilly, D., Hahnfeldt, R., Ziegler, V., Fremter, K., Rinschen, M. M., Helmstädt, M., Ebert, L. K., Castrop, H., Hackl, M. J., Walz, Gerd, Brinkkoetter, P. T., Liebau, M. C., Tory, K., Hoyer, P. F., Beck, B. B., Brismar, H., Blom, H., Schermer, B., & Benzing, T. (2020). A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nature Metabolism*, 2(5), 461–474. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0204-y>
5. Cases, A., Egocheaga, M. I., Tranche, S., Pallarés, V., Ojeda, R., Górriz, J. L., & Portolés, J. M. (2018). Anemia en la enfermedad renal crónica: protocolo de estudio, manejo y derivación a Nefrología. *Nefrología*, 38(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2017.09.004>
6. Chalhoub, S., Langston, C., & Eatroff, A. (2011). Anemia of renal disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13(9), 629–640. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2011.07.016>
7. Chortara, I., Tsokana, C. N., Pavlidou, E., Sandri, T. L., Wright, A., & Valiakos, G. (2025). Real-world data on canine chronic kidney disease in Greece: clinical and quality of life insights. *Frontiers in Veterinary Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1601044>
8. Cobrin, A. R., Blois, S. L., Kruth, S. A., Abrams-Ogg, A. C. G., & Dewey, C. (2013). Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. *Journal of Small Animal Practice*, 54(12), 647–655. <https://doi.org/10.1111/j.sap.12150>
9. Comper, W. D., Vuchkova, J., & McCarthy, K. J. (2022). New insights into proteinuria/albuminuria. *Frontiers in Physiology*, 13, 991756. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.991756>
10. Cowgill, L. D., Polzin, D. J., Elliott, J., Nabity, M. B., Segev, G., Grauer, G. F., Brown, S., Langston, C., & van Dongen, A. M. (2016). Is progressive chronic kidney disease a slow acute kidney injury? *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 46(6), 995–1013. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.06.001>
11. Cridge, H., Wills, R. W., & Lathan, P. (2018). Correlation between urine color and urine specific gravity in dogs: Can urine color be used to identify concentrated urine? *The Canadian Veterinary Journal*, 59(2), 178–180.
12. Cunha, R. S. d., Santos, A. F., Barreto, F. C., & Stinghen, A. E. M. (2020). How do uremic toxins affect the endothelium? *Toxins*, 12(6), 412. <https://doi.org/10.3390/toxins12060412>
13. Geddes, R. F., Finch, N. C., Syme, H. M., & Elliott, J. (2013). The role of phosphorus in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 23(2), 122–133. Portico. <https://doi.org/10.1111/vec.12032>
14. Gluba-Brzózka, A., Franczyk, B., Olszewski, R., & Rysz, J. (2020). The influence of inflammation on anemia in CKD patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 725. <https://doi.org/10.3390/ijms21030725>
15. Hokamp, J. A., Cianciolo, R. E., Boggess, M., Lees, G. E., Benali, S. L., Kovarsky, M., & Nabity, M. B. (2016). Correlation of urine and serum biomarkers with renal damage and survival in dogs with naturally occurring proteinuric chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(2), 591–601. <https://doi.org/10.1111/jvim.13832>
16. Holm, L. P., Hawkins, I., Robin, C., Newton, R. J., Jepson, R., Stanzani, G., McMahon, L. A., Pesavento, P., Carr, T., Cogan, T., Couto, C. G., Cianciolo, R., & Walker, D. J. (2015). Cutaneous and renal glomerular vasculopathy as a cause of acute kidney injury in dogs in the UK. *Veterinary Record*, 176(15), 384. Portico. <https://doi.org/10.1136/vr.102892>
17. Kim, J., Lee, C.-M., & Kim, H.-J. (2020). Biomarkers for chronic kidney disease in dogs: a comparison study. *Journal of Veterinary Medical Science*, 82(8), 1130–1137. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0125>
18. Kulka, M., Szopa, I. M., Mizera-Szpilka, K., & Klockiewicz, M. (2026). Stress-related immunomodulation of canine lymphocyte responses and hematologic profiles. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(3), 1506. <https://doi.org/10.3390/ijms27031506>
19. Le Sueur, A. N. V., Gerald, S. S., Melchert, A., Takahira, R. K., Coyne, M., Murphy, R., Szlosek, D., & Guimarães-Okamoto, P. T. C. (2019). Symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with International Renal Interest Society stage 4 chronic kidney disease undergoing intermittent hemodialysis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(6), 2635–2643. <https://doi.org/10.1111/jvim.15612>
20. LeVine, D. N., Cianciolo, R. E., Linder, K. E., Bizikova, P., Birkenheuer, A. J., Brooks, M. B., Salous, A. K., Nordone, S. K., Bellinger, D. A., Marr, H., Jones, S. L., Fischer, T. H., Deng, Y., Mazepa, M., & Key, N. S. (2017). Endothelial alterations in a canine model of immune thrombocytopenia. *Platelets*, 30(1), 88–97. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1378807>
21. Lippi, I., Perondi, F., Lubas, G., Gori, E., Pierini, A., D'Addetta, A., & Marchetti, V. (2021). Erythrogram patterns in dogs with chronic kidney disease. *Veterinary Sciences*, 8(7), 123. <https://doi.org/10.3390/vet807123>
22. Lotfalizadeh, N., & Nazifi, S. (2026). Clinical applications of blood cell ratios in veterinary hematology: From diagnosis to prognosis. *Veterinary and Animal Science*, 32, 100622. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2026.100622>
23. Marks, S. L., Kook, P. H., Papich, M. G., Tolbert, M. K., & Willard, M. D. (2018). ACVIM consensus statement: Support for rational administration of gastrointestinal protectants to dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), 1823–1840. <https://doi.org/10.1111/jvim.15337>
24. Michael, H., Szlosek, D., Clements, C., & Mack, R. (2022). Symmetrical dimethylarginine: evaluating chronic kidney disease in the era of multiple kidney biomarkers. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 52(3), 609–629. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.01.003>
25. Mitchell, T., Verma, V., Fajol, A., & Faul, C. (2026). The effects of elevated phosphate on the kidney - damaging the gatekeeper. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 478(4), 34. <https://doi.org/10.1007/s00424-026-03160-5>
26. Motrenikova, M., Boyanov, K., Bojinova, N., & Bivolarska, A. (2025). Stress pathways in chronic kidney disease: linking cortisol, oxidative stress, and inflammation. *Antioxidants*, 14(10), 1259. <https://doi.org/10.3390/antiox14101259>
27. Ostrovskyi, O. Y., & Slivinska, L. G. (2023). Prevalence and features of early diagnosis of chronic kidney disease in cats. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series «Veterinary Sciences»*, 25(112), 98–106. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11216>
28. Pauker, K., Filipjeva, Z., Mareš, J., Vávra, M., Rehakova, K., Proks, P., Gabriel, V., & Crha, M. (2024). A comprehensive analysis of albuminuria in canine chronic kidney disease. *Veterinary Medicine and Science*, 10(2), e1403. <https://doi.org/10.1002/vms3.1403>
29. Perini-Perera, S., Del-Ángel-Caraza, J., Pérez-Sánchez, A. P., Quijano-Hernández, I. A., & Recillas-Morales, S. (2021). Evaluation of chronic kidney disease progression in dogs with therapeutic management of risk factors. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 621084. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.621084>

30. Podkowińska, A., & Formanowicz, D. (2020). Chronic kidney disease as oxidative stress- and inflammatory-mediated cardiovascular disease. *Antioxidants*, 9(8), 752. <https://doi.org/10.3390/antiox9080752>
31. Sargent, H. J., Elliott, J., & Jepson, R. E. (2020). The new age of renal biomarkers: does SDMA solve all of our problems? *Journal of Small Animal Practice*, 62(2), 71–81. <https://doi.org/10.1111/jsap.13236>
32. Schmitt, R., & Melk, A. (2017). Molecular mechanisms of renal aging. *Kidney International*, 92(3), 569–579. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.02.036>
33. Segev, G., Cortellini, S., Foster, J. D., Francey, T., Langston, C., Londoño, L., Schweighauser, A., & Jepson, R. E. (2024). International Renal Interest Society best practice consensus guidelines for the diagnosis and management of acute kidney injury in cats and dogs. *The Veterinary Journal*, 305, 106068. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2024.106068>
34. Souma, T., Suzuki, N., & Yamamoto, M. (2015). Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. *Frontiers in Physiology*, 6, 167. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00167>
35. Vinodhini, J., Abiramy Prabavathy, A., Uma, S., Barathiraja, S., Rajkumar, K., Thanislass, J., & Vijayalakshmi, P. (2021). Clinico-biochemical findings associated with stage III and stage IV of chronic kidney disease in dogs. *International Journal of Veterinary Science and Research*, 156–162. <https://doi.org/10.17352/ijvsvr.000096>

ORCID

- | | |
|---|---|
| N. Kanivets  | https://orcid.org/0000-0001-9520-2999 |
| T. Burda  | https://orcid.org/0000-0002-2262-9040 |
| S. Zarytskyi  | https://orcid.org/0000-0001-9186-6122 |
| L. Karysheva  | https://orcid.org/0000-0002-0124-4774 |
| K. Suprunenko  | https://orcid.org/0000-0003-4715-0738 |



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Study of the acute toxicity of the preparation «SEKOBREN» following intragastric administration to laboratory rats

O. Brezvyn¹ | A. Vysotskyi² | B. Gutyj² | H. Rudyk¹

Article info

Correspondence Author
B. Gutyj
E-mail:
bvh@ukr.net¹ State Scientific-Research
Control Institute of Veterinary
Medicinal Products and Feed
Additives,
Donetska Str., 11, Lviv,
79019, Ukraine² Stepan Gzhyskyi National
University of Veterinary
Medicine and
Biotechnologies Lviv,
Pekarska Str., 50, Lviv,
79010, Ukraine**Citation:** Brezvyn, O., Vysotskyi, A., Gutyj, B., & Rudyk, H. (2026). Study of the acute toxicity of the preparation «SEKOBREN» following intragastric administration to laboratory rats. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 54–59. doi: 10.31210/spi2026.29.02.08

The aim of the study was to conduct a comprehensive assessment of the acute toxicity parameters of the veterinary disinfectant preparation «Sekobren» (1000 mg/L sodium hypochlorite) under the conditions of an acute experiment. The study was performed on 40 white Wistar rats of both sexes with a body weight of 120–220 g. The animals were divided into four groups of 10 individuals each. The preparation was administered intragastrically once in volumes of 5 mL (Group II), 10 mL (Group III), and 15 mL (Group IV). The control group received 5 mL of 0.9 % sodium chloride solution. Daily clinical monitoring of the general condition of the animals, body weight dynamics, body temperature, respiratory rate, and heart rate was carried out for 15 days. On the 15th day, hematological and biochemical blood parameters and organ weight coefficients were determined. Statistical processing of the results was performed using methods of variation statistics with Microsoft Excel and STATISTICA 10.0 software. It was established that the administration of «SEKOBREN» at the studied doses was not accompanied by animal mortality, inadequate behavioral reactions, or pronounced clinical signs of intoxication. Body weight dynamics were positive in all groups. In Groups II and III, a statistically significant increase in the number of erythrocytes, hemoglobin, and leukocytes was observed, indicating the development of adaptive-compensatory reactions. In Group IV, a significant increase in the erythrocyte intoxication index was noted. Analysis of the protein spectrum of blood serum showed a dose-dependent increase in the albumin fraction and a decrease in γ -globulins. The study of internal organ weight coefficients revealed compensatory-hyperplastic changes in the liver, kidneys, and heart, most pronounced in Groups III and IV. The obtained results allow us to conclude that the preparation «SEKOBREN», when administered intragastrically in doses up to 15 mL per animal, does not cause the development of pronounced acute toxicity. The detected changes are predominantly of an adaptive-compensatory nature and remain within the limits of the organism's physiological adaptation. This indicates the relative safety of the preparation and substantiates the prospects for its further study and use as a universal disinfectant and antiseptic agent in veterinary practice.

Keywords: SEKOBREN, sodium hypochlorite, acute toxicity, veterinary biosafety, disinfection, antimicrobial resistance, industrial animal husbandry, adaptive reactions.

Вивчення гострої токсичності препарату «СЕКОБРЕН» за умови внутрішньошлункового введення лабораторним щурам

О. М. Брезвин¹ | А. О. Висоцький² | Б. В. Гутий² | Г. В. Рудик¹¹ Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів, Україна² Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна

Мета дослідження полягала у комплексній оцінці параметрів гострої токсичності ветеринарного дезінфікуючого препарату «СЕКОБРЕН» (концентрація 1000 мг/л гіпохлориту натрію) в умовах гострого експерименту. Дослідження виконано на 40 білих щурах лінії Wistar обох статей масою тіла 120–220 г. Тварин розподілили на чотири групи по 10 особин у кожній. Концентрація діючої речовини (гіпохлориту натрію) у препараті становила 1000 мг/л. Препарат вводили внутрішньошлунково одноразово в об'ємах 5 мл (II група), 10 мл (III група) та 15 мл (IV група). Контрольній групі вводили 5 мл 0,9 % розчину натрію хлориду. Протягом 15 діб проводили щоденний клінічний моніторинг загального стану тварин, динаміки маси тіла, температури тіла, частоти дихання та серцевих скорочень. На 5-ту добу після введення препарату проводили дослідження гематологічних та біохімічних показників, макроскопічний аналіз внутрішніх органів і визначали коефіцієнти маси внутрішніх органів (печінки, селезінки, нирок). Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програм Microsoft Excel та STATISTICA 10.0. Встановлено, що за введення найвищої концентрації препарату «СЕКОБРЕН» у досліджених дозах були відсутні летальність тварин, а також неадекватні поведінкові реакції та виражені клінічні ознаки гострої інтоксикації. Динаміка маси тіла в досліджуваних тварин була позитивною. У щурів II та III груп виявлено статистично значуще підвищення кількості еритроцитів і лейкоцитів, концентрації гемоглобіну, що свідчить про розвиток адаптивно-компенсаторних реакцій. У тварин IV групи відзначалося значне підвищення еритроцитарного індексу інтоксикації. Аналіз білкового спектру сироватки крові показав дозозалежне підвищення частки альбумінів і зниження γ -глобулінів. Дослідження коефіцієнтів маси внутрішніх органів виявило компенсаторно-гіперпластичні зміни в печінці, нирках та серці, найбільш виражені в щурів III та IV груп. За сукупністю клінічних, гематологічних, біохімічних та морфометричних показників препарат «СЕКОБРЕН» при внутрішньошлунковому введенні в найвищій концентрації 1000 мг/л не спричиняв розвитку вираженої гострої токсичності. Виявлені зміни носили переважно адаптивно-компенсаторний характер із розвитком дозозалежних компенсаторно-гіперпластичних змін, а досліджувані показники знаходились в межах фізіологічної норми для лабораторних щурів. При цьому, отримані результати дозволяють віднести «СЕКОБРЕН» до малонебезпечних речовин четвертого класу токсичності і обґрунтовують перспективність його подальшого вивчення як дезінфікуючого та антисептичного засобу у ветеринарній медицині.

Ключові слова: «СЕКОБРЕН», гіпохлорит натрію, гостра токсичність, ветеринарна біобезпека, дезінфекція, антимікробна резистентність, промислове тваринництво, адаптивні реакції.**Бібліографічний опис для цитування:** Брезвин О. М., Висоцький А. О., Гутий Б. В., Рудик Г. В. Вивчення гострої токсичності препарату «СЕКОБРЕН» за умови внутрішньошлункового введення лабораторним щурам. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 54–59.

Вступ

Інфекційні та інвазійні захворювання сільсько-господарських тварин залишаються однією з найбільш серйозних проблем сучасного промислового тваринництва. Вони спричиняють значні економічні збитки через зниження продуктивності, загибель тварин, погіршення якості продукції, а також створюють реальну загрозу продовольчій безпеці держави та здоров'ю людини через зоонози [1, 2].

Особливою гостротою проблема набуває в умовах інтенсивного тваринництва, де висока концентрація тварин на обмеженій території створює ідеальні умови для швидкого поширення інфекцій. За таких обставин навіть незначне порушення ветеринарно-санітарного режиму може призвести до спалахів захворювань, що супроводжуються мільйонними збитками для агропідприємств [3].

Ситуація значно ускладнюється стрімким поширенням антимікробної резистентності. Мульти-резистентні штами бактерій (зокрема ESKAPE-групи) стають серйозною загрозою не лише для ветеринарної медицини, а й для громадського здоров'я [4, 5]. Надмірне та часто неконтрольоване використання антибіотиків у тваринництві лише посилює цю проблему, роблячи лікування інфекцій неефективним і економічно витратним [5].

У таких умовах одним із найважливіших стратегічних напрямків ветеринарної біобезпеки стає профілактика інфекційних захворювань шляхом забезпечення високоефективної дезінфекції та антисептичної обробки. Пошук доступних, потужних, безпечних і економічно вигідних дезінфікуючих засобів є пріоритетним завданням сучасної ветеринарної науки та практики [6].

Препарати активного кисню (гіпохлорити натрію та кальцію, хлорнувата кислота, хлораміни тощо) в останні роки демонструють високу ефективність у системі ветеринарно-санітарного захисту тваринницьких об'єктів [7, 8]. Їхня антимікробна дія має неспецифічний окисний характер і унеможливає розвиток резистентності у мікроорганізмів [7, 9].

Крім вираженої бактерицидної, віруліцидної, фунгіцидної та спороцидної дії, ці препарати характеризуються швидким розпадом до безпечних сполук, низькою токсичністю та прийнятною вартістю [8].

Препарат «СЕКОБРЕН» є сучасним представником цієї групи. Його діюча речовина – гіпохлорит натрію – отриманий у спеціально розробленому бездіафрагмовому проточному електролізері шляхом електролізу розчину натрію хлориду. Препарат виготовлений з сировини високої хімічної чистоти, не містить органічних домішок, молекулярного хлору, токсичних хлоратів і хлоритів та має стабільні фізико-хімічні властивості.

Подібні розчини: «Септокс», «ВЕТОКС-1000», «Вітосепт» вже успішно застосовуються у ветеринарній практиці, і є розробкою співпраці ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок та кафедри неорганічної хімії ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет» [10–13].

Спираючись на актуальність проблеми біобезпеки в тваринництві, необхідність зниження антибіотико-резистентності та економічну доцільність ефективної профілактики, нами проведено комплексне хіміко-фізичне, мікробіологічне, токсикологічне та фармакологічне дослідження препарату «СЕКОБРЕН» з метою наукового обґрунтування його використання як універсального дезінфікуючого та антисептичного засобу [14, 15].

Мета дослідження

Мета роботи – провести комплексну оцінку гостроти токсичності нового препарату «СЕКОБРЕН» (на основі гіпохлориту натрію) за внутрішньошлункового введення лабораторним тваринам.

Матеріали і методи

Експериментальну частину роботи виконували у віварії Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. Дослідження на лабораторних тваринах проводили відповідно до чинних нормативних документів, а саме: «Методичних рекомендацій з доклінічних досліджень ветеринарних лікарських засобів» [16], «Методичних рекомендацій щодо токсикологічного контролю нових засобів захисту тварин» [17], а також згідно з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях [18] і рішеннями Першого національного конгресу з біоетики [19].

Гостру токсичність препарату «СЕКОБРЕН» вивчали на 40 клінічно здорових білих щурах лінії Wistar обох статей з масою тіла 120–125 г.

Тварин методом рандомізації розподілили на чотири групи по 10 голів у кожній (по 5 самців і 5 самок). Дослід тривав 15 діб. На початку експерименту тварини пройшли 10-денний адаптаційний період у стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та годівлі повнораціонним комбікормом [20].

I група (контрольна) – тваринам внутрішньошлунково вводили 5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Тварини дослідних груп отримували «СЕКОБРЕН», з концентрацією 1000 мг/л: II група – 10 мл/гол., III група – 15 мл/гол., IV група – 20 мл/гол. Препарат та розчин контролю вводили натще, за допомогою зонда з тупим кінцем, введення проводили малими дозами по 5 мл з інтервалом 5 год.

Упродовж усього дослідження тварини перебували в 12-годинному світловому режимі, за температури 20–22 °C, відносній вологості 50–60 % та в однакових умовах утримання і годівлі.

Протягом експерименту щоденно оцінювали загальний стан тварин, їхню поведінку, стан шерстного покриву та видимих слизових оболонок, споживання корму і води, частоту дихання і серцевих скорочень, а також фіксували динаміку зміни маси тіла.

На 5-ту добу після введення досліджуваного препарату проводили евтаназію щурів методом

декапітації під легким ефірним наркозом і відбирали кров. Після центрифугування при 3000 об/хв протягом 15 хвилин отримували плазму та еритроцитарну масу. У крові визначали гематологічні показники (кількість еритроцитів, лейкоцитів, концентрацію гемоглобіну, еритроцитарний індекс інтоксикації) та біохімічні показники (загальний білок, білкові фракції), проводили макроскопічний аналіз внутрішніх органів, а також визначали відносну масу внутрішніх органів (печінки, селезінки, нирок) за загальноприйнятими методами.

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програм Microsoft Excel та STATISTICA 10.0. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного та його

стандартної помилки ($M \pm m$). Різницю між групами вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Гематологічні показники є чутливими індикаторами загального стану організму та його реакції на дію ксенобіотиків. Аналіз гематологічних показників є одним із ключових критеріїв оцінки токсичної дії препарату та загального адаптаційного потенціалу організму. Отримані результати досліджуваних гематологічних показників шурів за внутрішньошлункового введення препарату «СЕКОБРЕН» концентрації 1000 мг/л представлені в *таблиці 1*.

Таблиця 1

Гематологічні показники шурів за внутрішньошлункового введення препарату «СЕКОБРЕН» (концентрація 1000 мг/л) ($M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Показники			
	еритроцити, Т/г	лейкоцити, Г/л	гемоглобін, г/л	еритроцитарний індекс інтоксикації
Контроль	5,80±0,18	7,80±0,52	117,4±4,2	21,8±1,35
II – 10 мл	6,20±0,21***	9,40±0,61***	128,3±3,8***	25,8±1,42***
III – 15 мл	6,30±0,19***	9,70±0,48***	120,9±4,1*	26,7±1,58***
IV – 20 мл	5,70±0,22	10,1±0,55***	114,9±4,6	46,7±2,81***

Примітка: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ – у порівнянні з показниками тварин контрольної групи.

Аналіз даних, наведених у *таблиці 1*, свідчить, що внутрішньошлункове введення препарату «СЕКОБРЕН» у досліджених дозах не спричиняє розвитку вираженої гемотоксичної дії, токсичної анемії або пригнічення еритропоезу. У тварин II та III дослідних груп спостерігалось статистично значуще ($p < 0,001$) підвищення кількості еритроцитів на 6,9 та 8,6 % відповідно та концентрації гемоглобіну на 9,3 % у II групі порівняно з показниками тварин контрольної групи.

Такі зміни, ймовірно, мають компенсаторно-приспосувальний характер і можуть бути пов'язані з активацією еритропоезу у відповідь на легке гіпоксичне або окисне навантаження, спричинене введенням препарату. Одночасно в цих групах відзначалося вірогідне підвищення лейкоцитарного пулу відповідно на 20,5 та 24,4 % порівняно з контролем. На нашу думку, це може вказувати на розвиток помірної лейкоцитарної реакції, характерної для адаптаційного процесу.

У тварин IV групи (максимальна доза) картина була дещо іншою. Кількість еритроцитів та гемоглобіну статистично не відрізнялася від контролю, проте еритроцитарний індекс інтоксикації зріс більш ніж удвічі ($p < 0,001$) і суттєво перевищував верхню межу фізіологічної норми. Це свідчить про розвиток певних деструктивних процесів у еритроцитарній ланці (збільшення кількості деформованих еритроцитів), що є характерною ознакою напруження адаптаційних механізмів при дії вищої дози ксенобіотика.

Зростання кількості лейкоцитів у всіх дослідних групах (максимально – на 29,5 % у IV групі) відбувалося в межах фізіологічної норми і, найімовірніше, відображало активацію захисних систем організму без розвитку вираженого запального процесу.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що препарат «СЕКОБРЕН» у концентрації 1000 мг/л за внутрішньошлункового введення чинить дозозалежний вплив на гематологічні показники шурів. Зміни носять переважно адаптивно-компенсаторний характер у тварин II та III груп і лише при введенні максимальної дози (IV група) проявляються ознаки помірного напруження еритроцитарної системи. Відсутність вираженої анемії, лейкопенії чи значного пригнічення кровотворення свідчить про відносно низьку гемотоксичність досліджуваного препарату в умовах гострого експерименту.

Аналіз білкового спектру сироватки крові є одним із важливих критеріїв оцінки функціонального стану організму під впливом ксенобіотиків.

Отримані результати щодо вміст загального білка та його фракційного складу у крові шурів за вивчення гострої токсичності препарату «СЕКОБРЕН» представлено в *таблиці 2*.

Введення досліджуваного препарату у концентрації 1000 мг/л не супроводжувалося вірогідними змінами рівня загального білка сироватки крові шурів дослідних груп порівняно з контролем. Це свідчить про відсутність вираженого порушення білок-синтезуючої функції печінки та загального білкового обміну в умовах гострого експерименту.

Водночас відзначалися чіткі дозозалежні зміни у співвідношенні білкових фракцій. У дослідних тварин II, III та IV груп спостерігалось статистично високостовірне ($p < 0,001$) підвищення відносного вмісту альбумінів відповідно на 17,2, 33,0 та 35,3 % порівняно з контролем. Таке зростання може свідчити про активацію компенсаторно-приспосувальних механізмів, спрямованих на підтримання колоїдно-осмотичного тиску плазми та транспортної функції крові у відповідь на введення ксенобіотика.

Таблиця 2

Рівень загального білка та його фракційний склад у крові щурів за вивчення гострої токсичності препарату «СЕКОБРЕН» ($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Групи тварин			
	I контроль	«СЕКОБРЕН», 1000 мг/л		
		II – 10 мл	III – 15 мл	IV – 20 мл
Загальний білок, г/л	77,0 $\pm$ 1,12	78,8 $\pm$ 0,98	75,2 $\pm$ 1,45	76,2 $\pm$ 1,27
Альбумін, %	34,8 $\pm$ 0,85	40,8 $\pm$ 1,12***	46,3 $\pm$ 0,97***	47,1 $\pm$ 1,03***
α_1 -глобуліни, %	11,2 $\pm$ 0,42	11,7 $\pm$ 0,38	11,4 $\pm$ 0,51	10,8 $\pm$ 0,46
α_2 -глобуліни, %	12,8 $\pm$ 0,61	12,1 $\pm$ 0,55	11,9 $\pm$ 0,48	11,7 $\pm$ 0,52
β -глобуліни, %	17,2 $\pm$ 0,74	17,8 $\pm$ 0,82	17,3 $\pm$ 0,69	17,5 $\pm$ 0,71
γ -глобуліни, %	24,0 $\pm$ 0,69	17,6 $\pm$ 0,55***	13,1 $\pm$ 0,11***	12,9 $\pm$ 0,12***

Примітка: *** – $p < 0,001$ – у порівнянні з показниками тварин контрольної групи.

Паралельно з підвищенням альбумінів зареєстровано статистично вірогідне ($p < 0,001$) зниження частки γ -глобулінів у щурів II, III та IV груп відповідно на 26,7, 45,4 та 46,3 %, порівняно з показником тварин контрольної групи. Зниження рівня γ -глобулінів, до яких належать імуноглобуліни, на нашу думку, може вказувати на певне пригнічення гуморальної ланки імунітету або перерозподіл білкових фракцій на тлі активації синтезу альбумінів.

Зміни рівнів α_1 -, α_2 - та β -глобулінів у тварин дослідних груп були статистично недостовірними або мали тенденційний характер і залишалися в межах фізіологічної норми. Це, можливо, свідчить про відсутність вираженої гострофазної реакції запалення або значного порушення функціонального стану гепатоцитів.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що препарат «СЕКОБРЕН» у концентрації 1000 мг/л при внутрішньошлунковому введенні чинить помірний вплив на білковий обмін у щурів,

який проявляється переважно у вигляді компенсаторного підвищення альбумінової фракції та відповідного зниження γ -глобулінів. Такі зміни мають адаптивний характер і не виходять за межі фізіологічної норми, що є важливим свідченням відносної безпеки досліджуваного препарату під час застосування в найвищій концентрації.

Дослідження коефіцієнтів маси внутрішніх органів є важливим критерієм оцінки впливу ксенобіотиків на організм лабораторних тварин. Зміни цього показника відображають як можливе пряме токсичне ураження органів, так і розвиток компенсаторно-адаптивних реакцій.

Аналіз отриманих даних (табл. 3) показав, що введення препарату «СЕКОБРЕН» супроводжувалося статистично значущими дозозалежними змінами маси внутрішніх органів. У щурів III та IV дослідних груп встановлено вірогідне ($p < 0,001$) збільшення коефіцієнта маси печінки на 18,8 % порівняно з контролем.

Таблиця 3

Коефіцієнти маси внутрішніх органів щурів за умов вивчення гострої токсичності препарату «СЕКОБРЕН», концентрацією 1000 мг/л ($M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Показник, %			
	печінка	селезінка	нирки	серце
Контроль	3,20 $\pm$ 0,12	0,50 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,03
II – 10 мл	3,30 $\pm$ 0,11	0,40 $\pm$ 0,03***	0,70 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,02
III – 15 мл	3,80 $\pm$ 0,14***	0,60 $\pm$ 0,05**	0,90 $\pm$ 0,06***	0,50 $\pm$ 0,04**
IV – 20 мл	3,80 $\pm$ 0,13***	0,60 $\pm$ 0,04***	0,80 $\pm$ 0,05**	0,50 $\pm$ 0,03***

Примітка: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – у порівнянні з показниками тварин контрольної групи.

Таке підвищення, найімовірніше, свідчить про активацію функціонального навантаження на органи детоксикації у відповідь на метаболізм введенного ксенобіотика.

Зміни маси селезінки мали різноспрямований характер. У щурів II групи спостерігалось статистично значуще зменшення цього показника на 20 % ($p < 0,001$), у той же час у тварин III та IV груп відзначалося вірогідне збільшення цього показника відповідно на 20 % ($p < 0,01$ та $p < 0,001$) порівняно з контролем. На нашу думку, збільшення маси селезінки може бути пов'язане з активацією імунних процесів і проліферацією клітин моноклеарної фагоцитарної системи.

Коефіцієнти маси нирок статистично значуще зростали у щурів III та IV груп відповідно на 28,6 та 14,3 %, порівняно з контролем, що, ймовірно, відображає посилення екскреторної функції нирок під

час виведення препарату. Аналогічно, у тварин цих груп зареєстровано вірогідне збільшення коефіцієнта маси серця на 25 % ($p < 0,01$ – $0,001$) порівняно з показником тварин контрольної групи, що може свідчити про компенсаторну гіперплазію кардіоміоцитів у відповідь на підвищене функціональне навантаження.

Таким чином, отримані результати демонструють розвиток дозозалежних компенсаторно-гіперпластичних змін маси внутрішніх органів під впливом препарату «СЕКОБРЕН» у найвищій концентрації 1000 мг/л. Найбільш виражені адаптивні реакції спостерігалися в органах детоксикації (печінці, нирках) та серці. Виявлені зміни мають переважно адаптивний характер і не супроводжуються ознаками вираженого токсичного ураження, що свідчить про відносну безпеку досліджуваного препарату в умовах гострого експерименту.

Під час гострого токсикологічного експерименту щоденно проводили клінічний моніторинг загального стану лабораторних тварин. Аналіз даних, представлених у *таблиці 4*, свідчить про відсутність виражених клінічних проявів інтоксикації в усіх дослідних групах.

Під час дослідів летальних випадків, неадекватних поведінкових реакцій, пригнічення або збудження

серед тварин не зафіксовано. Дослідні щури не відрізнялися від тварин контрольної групи за фізіологічними та поведінковими ознаками. Вони демонстрували нормальне споживання корму та води, блідо-рожевий колір видимих слизових оболонок, а шлунково-кишковий тракт і сечовидільна система функціонували без відхилень та відповідали межах фізіологічної норми для цього виду тварин.

Таблиця 4

Клінічні спостереження за щурами в досліді з вивчення гострої токсичності «СЕКОБРЕН» ($M \pm m$, $n = 10$)

Показники	Групи тварин			
	«СЕКОБРЕН», 1000 мг/л			
	контроль I – 5 мл 0,9 % NaCl	II – 10 мл	III – 15 мл	IV – 20 мл
Початкова маса тіла, г	121,8 $\pm$ 2,6	123 $\pm$ 3,5	122,2 $\pm$ 7	120,8 $\pm$ 2,3
Кінцева маса тіла, г	122,1 $\pm$ 2,6	124 $\pm$ 1,6	123,2 $\pm$ 5,6	121,8 $\pm$ 3,2
Температура тіла, °C	37,8 $\pm$ 0,2	37,4 $\pm$ 0,4	37,2 $\pm$ 0,5	37,4 $\pm$ 0,6
Частота дих., рухів/хв	125 $\pm$ 5	124 $\pm$ 8	123 $\pm$ 8	125 $\pm$ 9
Розлади травного каналу	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні
Пульс, рухів/хв	458 $\pm$ 3	460 $\pm$ 10	459 $\pm$ 8	460 $\pm$ 3
Неадекватні реакції	відсутні	відсутні	відсутні	відсутні
Загибель тварин	відсутня	відсутня	відсутня	відсутня

Динаміка маси тіла була позитивною в тварин усіх груп, статистично значущих відмінностей між контрольною та дослідними групами не виявлено. Середньодобовий приріст маси тіла залишався в межах фізіологічної норми.

Показники температури тіла, частоти дихання та пульсу також не зазнавали суттєвих змін і коливалися в межах референтних значень для щурів лінії Wistar. Незначні коливання цих параметрів носили транзитний характер і не мали статистично значущих відмінностей порівняно з контролем.

Протягом періоду спостереження у щурів дослідних груп за умов введення «СЕКОБРЕН» у найвищій концентрації 1000 мг/л загибелі тварин не спостерігали; відповідно, напівлетальна доза (DL_{50}) не визначалася. Крім цього, досліджуваний розчин не спричиняв розвитку клінічно виражених ознак гострої токсичності. Зокрема, основні фізіологічні показники загальний клінічний стан тварин, температура тіла, частота дихання та серцевих скорочень, зростаюча динаміка маси тіла – не мали статистично значущих відмінностей порівняно з тваринами контрольної групи. При цьому виявлені зміни досліджуваних гематологічних та біохімічних показників мали адаптивний характер, не супроводжувалися ознаками вираженого токсичного ураження та не виходили за межі фізіологічної норми. Зміни білкового спектру сироватки крові проявлялися статистично вірогідним дозозалежним підвищенням частки альбумінів та відповідним зниженням γ -глобулінів, що відображають активацію компенсаторних механізмів підтримання колоїдно-осмотичного тиску та транспортної функції крові на фоні дії ксенобіотика. Однак рівень загального білка суттєво не змінювався. Дослідження коефіцієнтів маси внутрішніх органів виявило дозозалежні компенсаторно-гіперпластичні зміни, найбільш виражені в печінці, нирках та серці, що свідчать про посилення функціонального навантаження на органи детоксикації та екскреції, що є важливим свідченням відносної безпеки досліджуваного препарату.

Висновки

1. Таким чином, за сукупністю клінічних, гематологічних, біохімічних та морфометричних показників препарат «СЕКОБРЕН» при внутрішньошлунковому введенні у найвищій концентрації 1000 мг/л не спричиняв розвитку вираженої гострої токсичності.

2. Виявлені зміни носили переважно адаптивно-компенсаторний характер із розвитком дозозалежних компенсаторно-гіперпластичних змін, а досліджувані показники знаходилися в межах фізіологічної норми для лабораторних щурів.

3. Отримані дані дозволяють віднести «СЕКОБРЕН» до малонебезпечних речовин четвертого класу токсичності і обґрунтовують перспективність його подальшого вивчення як дезінфікуючого та антисептичного засобу у ветеринарній медицині.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Автори заявляють, що дослідження проводили у віварії ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок відповідно до «Методичних рекомендацій з доклінічних досліджень ветеринарних лікарських засобів», «Методичних рекомендацій щодо токсикологічного контролю нових засобів захисту тварин», Європейської конвенції про захист хребетних тварин та рішень Першого національного конгресу з біоетики.

Всі роботи з тваринами здійснювали з мінімальним стресом для тварин згідно із Законом України № 3447-IV та Директивою 2010/63/EU. Протокол дослідження затверджено Комісією з використання тварин та етичної експертизи Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок (протокол № 7 від 29.05.2020 р.).

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Висловлюємо щирі подяки академіку НААН Коцюмбасу І. Я. за консультативну допомогу в постановці дослідження та інтерпретації отриманих результатів.

Декларація щодо використання ІІІ та технологій на основі ІІІ

Автори заявляють, що не використовували штучний інтелект або технології на основі ІІІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. World Health Organization. (2022). *Global health estimates*. <https://www.who.int/data/global-health-estimates>
2. O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*. Review on Antimicrobial Resistance. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
3. Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00724-0)
4. European Centre for Disease Prevention and Control. (2023). *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net): Annual epidemiological report for 2022*. ECDC. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2022>
5. Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., Polachek, A. J., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J. D., & Ghali, W. A. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*, 1(8), e316–e327. [https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(17\)30141-9](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(17)30141-9)
6. Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2015). Disinfection, sterilization, and control of hospital waste. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 2, 3294–3309. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-4801-3.00301-5>
7. Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, 11(4), 147–157. <https://doi.org/10.4265/bio.11.147>
8. Block, S. S. (2001). *Disinfection, sterilization, and preservation* (5th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
9. McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.1.147>
10. Soltys, M. P., Gunchak, V. M., Rudyk, G. V., Gutj, B. V., Brezvy, O. M., & Vasiv, R. O. (2020). To assess the biocidal action of the drug based on sodium hypochlorite. *Colloquium-Journal*, 30(82), 11–16.
11. Soltys, M. P., Rudyk, H. V., Brezvy, O. M., Hunchak, V. M., Gutj, B. V., Hunchak, A. V., & Vasiv, R. O. (2022). The antiseptic activity of the drug, based on sodium hypochlorite in experimental and spontaneously infected wounds in animals. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series «Veterinary Sciences»*, 24(105), 73–82. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10511>
12. Hunchak, V. M., Soltys, M. P., Gutj, B. V., Hunchak, A. V., Vasiv, R. O., & Khariv, I. I. (2022). Dynamics of individual biochemical parameters of blood of intact white mice under the action of the drug “Vitosept”. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series «Veterinary Sciences»*, 24(106), 34–42. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10606>
13. Leshchyshyn, M. V., Dvylyuk, I. V., & Rykniuk, M. M. (2019). Efficiency of application of modern sanitation supplies in beekeeping. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series «Veterinary Sciences»*, 21(96), 185–191. <https://doi.org/10.32718/nvlvet9632>
14. Vysotskyi, A. O., Gutj, B. V., Kozenko, O. V., Krempa, N. Yu., Dvylyuk, I. V., Magrelo, N. V., Klym, H. V., Martyschuk, T. V., & Vus, U. M. (2025). Biosafety and biosecurity problems in Ukraine that arise during emergent infections. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series «Veterinary Sciences»*, 27(117), 74–79. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11710>
15. Brezvy, O. M., Rudyk, H. V., Kotsymbas, I. Ya., Kushnir, R. O., Dmitrikova, L. V., & Velichenko, O. B. (2025). Study of detoxification properties of hypochlorite acid solution in the back-ground of experimental fumonizotoxicosis in rats. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series «Veterinary Sciences»*, 27(118), 141–148. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11819>
16. Kotsymbas, I. Ya. (Ed.). (2006). *Doklinichni doslidzhennia vetrynarnykh likarskykh zasobiv* [Preclinical studies of veterinary medicinal products]. Triada plus. (in Ukrainian)
17. Kosenko, M. V., Malyk, O. H., Kotsymbas, I. Ya., Patereha, I. P., & Chura, D. O. (1997). *Toksikologichnyi kontrol novykh zasobiv zakhystu tvaryn: Metodychni rekomendatsii* [Toxicological control of new animal protection products: Methodical recommendations]. Kyiv. (in Ukrainian)
18. United Nations. (2000). No. 29468. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes: Concluded at Strasbourg on 18 March 1986*. United Nations Treaty Series, 1862, 610. <https://doi.org/10.18356/ec490af8-en-fr>
19. Pershyi natsionalnyi konhres z bioetyky (2001). *Rishennia Pershoho natsionalnoho konhresu z bioetyky* [First National Congress on Bioethics. Decisions of the First National Congress on Bioethics]. Kyiv. (in Ukrainian)
20. Kovalenko, V. M., Stefanov, O. V., Maksymov, Yu. M., & Trakhtenberh, I. M. (2001). *Ekspyrymentalne vyvchennia toksychnoi dii potentsiinykh likarskykh zasobiv* [Experimental study of the toxic action of potential medicinal products]. In O. V. Stefanov (Ed.), *Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv (metodychni rekomendatsii)* [Preclinical studies of medicinal products (methodical recommendations)] (pp. 74–97). Avicenna. (in Ukrainian)

ORCID

- O. Brezvy  <https://orcid.org/0000-0002-7401-3117>
A. Vysotskyi  <https://orcid.org/0000-0003-3149-8043>
B. Gutj  <https://orcid.org/0000-0002-5971-8776>
H. Rudyk  <https://orcid.org/0000-0002-4152-560X>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Diagnostic efficiency of coproovoscopy methods in the detection of strongylid eggs in the digestive tract of sheep

O. Natiahlyi✉

Article info

Correspondence Author

O. Natiahlyi

E-mail:

natyahlyy2@gmail.com

Poltava State Agrarian
University,
Skovoroda Str., 1/3,
Poltava, 36000, Ukraine**Citation:** Natiahlyi, O. (2026). Diagnostic efficiency of coproovoscopy methods in the detection of strongylid eggs in the digestive tract of sheep. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 60–64. doi: 10.31210/spi2026.29.02.09

Gastrointestinal nematodoses, in particular strongylidoses, lead to economic losses in livestock farms due to the negative impact of parasites on the body of ruminants, where, depending on the type of strongylids, they can cause anemia, diarrhea, weight loss, reduced productivity, and death. For laboratory diagnostics of strongylidoses of the digestive tract in animals, well-known flotation methods based on the microscopic detection of eggs are used. However, their sensitivity varies significantly, which can lead to a decrease in the effectiveness of diagnostic measures. The aim of the research was to investigate, in a comparative aspect, the sensitivity and effectiveness of known methods of coproovoscopy for strongylidoses of the digestive tract of sheep. Four flotation methods were tested under experimental conditions, namely: Dakhno's (with bischofite), Sorokova's (with a mixture of calcium and ammonium nitrate solutions), Starodub's (with a mixture of sugar and calcium nitrate solutions), and Petrenko's (with a mixture of calcium nitrate, sugar, and table salt solutions) with exposure times of 5, 10, and 15 minutes. The conducted studies established that all tested methods of coproovoscopy are sensitive and allow for the detection of 100 % of positive samples. At the same time, the most effective method, which allows for the isolation of the largest number of strongylid eggs from the digestive tract of sheep, was the Petrenko's method. With its use and an exposure of stool samples for 5 minutes, the intensity of strongylidosis exceeded the effectiveness of the Dakhno's method by 32.3 %, Sorokova's by 19.4 %, and Starodub's by 8.8 %. With exposures of 10 and 15 minutes, the effectiveness of the Petrenko's method exceeded the indicators of animal invasion by strongylids of the digestive tract obtained using the Dakhno's method by 36.1 % and 30.2 %, Sorokova's by 26.3 % and 22.5 %, and Starodub's by 19.5 % and 16.9 %, respectively. The obtained research results allow us to recommend the method where a mixture of calcium nitrate, sugar, and table salt solutions is used as a flotation fluid for effective intravital laboratory diagnostics of strongylidoses of the digestive tract in sheep.

Keywords: parasitology, sheep, strongylidoses, intravital diagnostics, coproovoscopy, efficiency.

Діагностична ефективність способів копроовоскопії під час виявлення яєць стронгілід травного тракту у овець

О. М. Натяглий

Полтавський державний
аграрний університет,
м. Полтава, Україна

Шлунково-кишкові нематодози, зокрема стронгілідози, призводять до економічних збитків тваринницьким господарствам унаслідок негативного впливу паразитів на організм жуйних. Залежно від виду стронгілід вони можуть спричинити анемію, діарею, втрату ваги, зниження продуктивності та загибель. Для лабораторної діагностики стронгілідозів травного тракту у тварин використовують загальновідомі способи флотації, які включають мікроскопічне виявлення яєць, і чутливість яких значно різниться, що може призвести до зниження ефективності проведення діагностичних заходів. Метою досліджень було дослідити у порівняльному аспекті чутливість та ефективність відомих способів копроовоскопії за стронгілідозів травного тракту овець. В експериментальних умовах проведено випробування чотирьох методів флотації, а саме: Дахна (із бішофітом), Сорокової (із сумішшю розчинів кальцієвої та аміачної селітри), Стародуба (із сумішшю розчинів цукру та кальцієвої селітри), Петренка (із сумішшю розчинів кальцієвої селітри, цукру та кухонної солі) за експозицій 5, 10 та 15 хвилин. Проведеними дослідженнями встановлено, що всі випробувані способи копроовоскопії є чутливими та дозволяють виявляти 100 % позитивних проб. Водночас найбільш ефективним способом, який дозволяє виділити найбільшу кількість яєць стронгілід травного тракту у овець, виявився спосіб Петренка. За його використання та експозиції копропроб 5 хв показники інтенсивності стронгілідозної інвазії перевищували результативність способів Дахна – на 32,3 %, Сорокової – на 19,4 %, Стародуба – на 8,8 %. За експозицій 10 та 15 хв ефективність способу Петренка перевищувала показники інвазованості тварин стронгілідами травного тракту, отримані за використання способів Дахна – на 36,1 та 30,2 %, Сорокової – на 26,3 та 22,5 %, Стародуба – на 19,5 та 16,9 % відповідно. Отримані результати досліджень дозволяють рекомендувати спосіб, де в якості флотанту використовують суміш розчинів кальцієвої селітри, цукру та кухонної солі, для ефективної зажиттєвої лабораторної діагностики стронгілідозів травного тракту у овець.

Ключові слова: паразитологія, віці, стронгілідози, зажиттєва діагностика, копроовоскопія, ефективність.**Бібліографічний опис для цитування:** Натяглий О. М. Діагностична ефективність способів копроовоскопії під час виявлення яєць стронгілід травного тракту у овець. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 60–64.

Вступ

Вівчарство є однією з найважливіших галузей сільського господарства в усьому світі [1]. Її рентабельність тісно пов'язана із ветеринарним благополуччям щодо інвазійних захворювань, особливо стронгілідозів травного тракту, де зараження тварин відбувається частіше на пасовищах [2, 3].

Значне поширення збудників стронгілід травного тракту серед жуйних тварин науковці пов'язують з декількома факторами. По-перше, було встановлено, що деякі дикі жуйні можуть виступати резервуарами паразитів, які, у свою чергу, можуть передаватися домашнім тваринам [4–6]. По-друге, було висловлено припущення, що зміна клімату може мати наслідки, які впливають на біологію передачі паразитів між дикими та домашніми тваринами. Наприклад, у випадку козулі (*Capreolus capreolus*) розширення популяцій і зміна середовища існування призвели до зміни ареалу хазяїна [7]. Загалом, з тенденцією до тепліших і вологих сезонів випасу це зрештою може призвести до збільшення зараженості паразитами домашніх жуйних [8].

Економічні втрати, спричинені гельмінтозами жуйних тварин, включають зменшення споживання корму та приросту живої ваги, збільшення частоти вибракування тварин, зниження продуктивності, а також витрати на лікування інвазованих тварин [9–11].

Дослідники зазначають, що найпоширенішими стронгілідами, що реєструються у дрібній рогатій худобі, є *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Nematodirus* spp. та *Oesophagostomum* spp. [12–14]. Зокрема, на території фермерських господарств Ефіопії загальна поширеність стронгілідозів травного тракту серед дрібної рогатой худоби становила 51,4 %. Стронгілідози виявилися більш поширеними у овець (74,6–84,8 %), ніж у кіз (58,6–68,6 %). Вищу зараженість тварин паразитами ($P < 0,05$) реєстрували у середньогір'ї та високогір'ї, ніж у низовинах, а також у дощовий сезон, ніж у посушливий. Результати посмертного дослідження показали, що загальна поширеність шлунково-кишкових стронгілід становила 97,7 %, де ідентифіковано загалом 11 видів нематод, серед яких домінували *Trichostrongylus axei*, *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus colubriformis* та *Haemonchus contortus* [15].

Відомо, що копроовоскопічна діагностика, яка ґрунтується на виявленні яєць у фекаліях, є швидким методом виявлення паразитів у тварин [16]. Причому науковцями доведено тісну кореляцію між кількістю виявлених яєць паразитів у молодняку тварин і тяжкістю перебігу інвазії [17, 18]. Однак інші дослідження показують, що окремі способи копроовоскопічної діагностики не завжди відображають реальний стан навантаження паразитів на організм хазяїна [19].

Мета дослідження

Метою досліджень став аналіз у порівняльному аспекті чутливості та ефективності відомих способів

копроовоскопії за стронгілідозів травного тракту овець.

Матеріали і методи

Роботу виконували впродовж 2025–2026 рр. на базі лабораторії кафедри паразитології та ветеринарно-санітарної експертизи Полтавського державного аграрного університету та в умовах вівчарських господарств Полтавської області.

Для визначення діагностичної ефективності сучасних способів копроовоскопії за стронгілідозів травного тракту овець проведено експериментальне випробування чотирьох різних способів, а саме:

- Дахна (із бішофітом);
- Сорокової (із сумішшю розчинів кальцієвої та аміачної селітри – 1 : 1,5);
- Стародуба (із сумішшю розчинів цукру та кальцієвої селітри – 1 : 1);
- Петренка (із сумішшю розчинів кальцієвої селітри, цукру та кухонної солі – 1,0 : 1,0 : 0,5) [20–23].

Для досліду використовували зразки фекалій від інвазованих стронгілідами травного тракту овець, що утримувалися у господарствах Полтавської області. Кожним способом було досліджено 14 зразків фекалій, а відстоювання фекальної суміші проводили за експозицій 5, 10 та 15 хв. Підрахунок кількості виявлених яєць стронгілід проводили у 1 г фекалій (яєць/г, ЯГФ).

Статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили визначенням середнього арифметичного (М), стандартного відхилення (SD) та рівня вірогідності (Р) з використанням методики однофакторного дисперсійного аналізу, використовуючи критерій Фішера.

Результати та їх обговорення

Проведеними дослідженнями встановлено, що всі випробувані способи копроовоскопії є чутливими і дозволяють виявляти 100 % позитивних проб. Водночас показники діагностичної ефективності за кількістю виявлених яєць стронгілід травного тракту у овець залежно від випробуваних способів копроовоскопії значно різнилися. Найбільш ефективним способом, який дозволяв виділити найбільшу кількість яєць стронгілід травного тракту, виявився спосіб Петренка, де в якості флотанту використовують суміш розчинів кальцієвої селітри, цукру та кухонної солі. Зокрема, за його використання та експозиції 5 хв показники інтенсивності стронгілідозної інвазії перевищували результативність способу Дахна на 32,3 % ($54,9 \pm 16,2$ яєць/г, $P < 0,001$), способу Сорокової – на 19,4 % ($65,4 \pm 17,0$ яєць/г, $P < 0,05$) та способу Стародуба – на 8,8 % ($74,0 \pm 17,7$ яєць/г) (рис. 1).

За експозиції копропроб 10 хв, також, найвищі значення інтенсивності стронгілідозної інвазії виявлено за використання способу Петренка порівняно зі способами Дахна – на 36,1 % ($97,1 \pm 36,2$ яєць/г, $P < 0,001$), способу Сорокової – на 26,3 % ($112,0 \pm 30,5$ яєць/г, $P < 0,01$) та способу Стародуба – на 19,5 % ($74,0 \pm 17,7$ яєць/г, $P < 0,05$) (рис. 2).

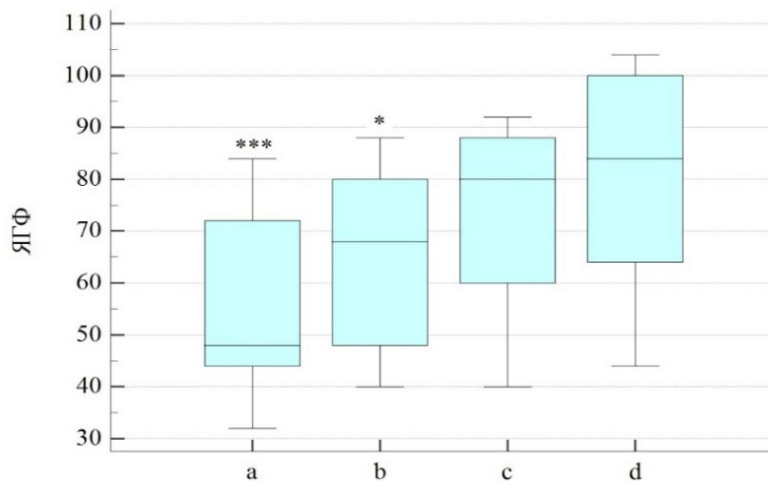


Рис. 1. Діагностична ефективність способів копроовоскопії за стронгілідозів травного тракту овець, експозиція 5 хв: а – спосіб Дахна; б – спосіб Сорокової; с – спосіб Стародуба; d – спосіб Петренка (n=14); *P<0,05, ***P<0,001 – порівняно зі способом d

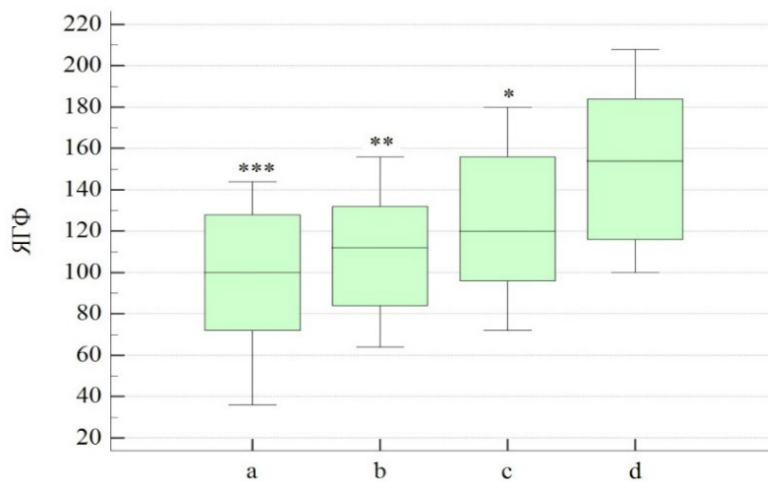


Рис. 2. Діагностична ефективність способів копроовоскопії за стронгілідозів травного тракту овець, експозиція 10 хв: а – спосіб Дахна; б – спосіб Сорокової; с – спосіб Стародуба; d – спосіб Петренка (n=14); *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 – порівняно зі способом d

За експозиції копропроб 15 хв отримали аналогічні результати, як за експозицій 5 та 10 хв. Так, найвищі показники інтенсивності стронгілідозної інвазії виявлено за використання способу

Петренка порівняно зі способами Дахна – на 30,2 % ($149,7 \pm 31,2$ яєць/г, $P < 0,001$), способу Сорокової – на 22,5 % ($166,3 \pm 39,8$ яєць/г, $P < 0,01$) та способу Стародуба – на 16,9 % ($178,3 \pm 46,6$ яєць/г, $P < 0,05$) (рис. 3).

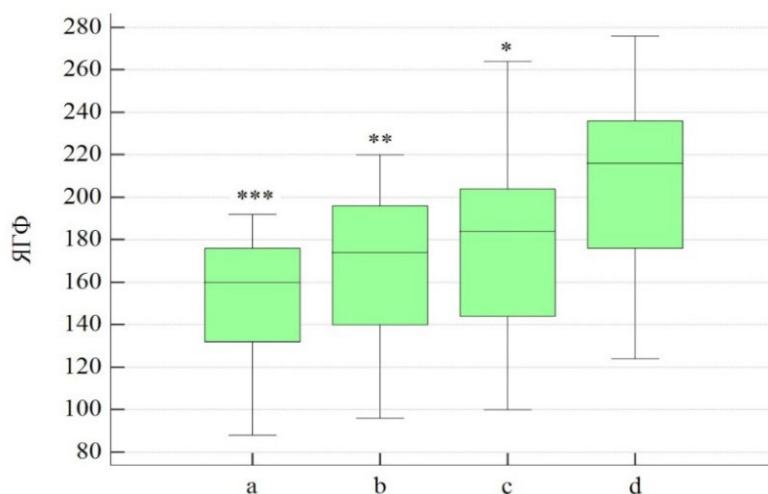


Рис. 3. Діагностична ефективність способів копроовоскопії за стронгілідозів травного тракту овець, експозиція 15 хв: а – спосіб Дахна; б – спосіб Сорокової; с – спосіб Стародуба; d – спосіб Петренка (n=14); *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 – порівняно зі способом d

Науковці всього світу повідомляють про значне поширення стронгілідозів травного тракту у жуйних тварин, що пов'язане із циклом розвитку паразитів, змінами клімату, особливостями пасовищного утримання дрібної рогатої худоби, можливістю передачі паразитів між дикими та домашніми тваринами, а також високою стійкістю паразитів у довкіллі [4–6, 15]. Тому актуальним є проведення своєчасної діагностики стронгілідозів із використанням найбільш ефективних методів копроовоскопії.

Проведеними дослідженнями встановлено, що випробувані способи Дахна (із бішофітом), Сорокової (із сумішшю розчинів кальцієвої та аміачної селітри), Стародуба (із сумішшю розчинів цукру та кальцієвої селітри), Петренка (із сумішшю розчинів кальцієвої селітри, цукру та кухонної солі) є чутливими та дозволяють виявляти 100 % позитивних проб із яйцями стронгілід травного тракту. Водночас найбільш ефективним способом, який дозволяє виділити найбільшу їх кількість, є спосіб Петренка, де показники інтенсивності стронгілідозної інвазії за експозиції копропроб 5 хв перевищували результативність способів Дахна – на 32,3 %, Сорокової – на 19,4 %, Стародуба – на 8,8 %. За експозицій 10 та 15 хв ефективність способу Петренка перевищувала показники інвазованості тварин стронгілідами травного тракту, отримані при використанні способів Дахна – на 36,1 та 30,2 %, Сорокової – на 26,3 та 22,5 %, Стародуба – на 19,5 та 16,9 % відповідно.

Є повідомлення в науковій літературі, де доведено високу діагностичну ефективність випробуваних способів за інших паразитозів. Зокрема, спосіб Петренка має вищу діагностичну ефективність за трихуриду овець, ніж способи Фюллеборна, Маллорі, Котельникова-Хренова, Галата і Мельничука, Манойло, Дахна – у 1,3–2,3 рази ($P < 0,05 \dots P < 0,005$) [23]. Разом з тим, спосіб Стародуба перевищував результативність під час лабораторної діагностики трихостронгілізу гусей способів Котельникова-Хренова, Маллорі, Мельничука – на 23,11–54,99 % ($P < 0,05 \dots P < 0,001$) [22], а спосіб Сорокової перевищував результативність під час лабораторної діагностики стронгілідозу овець способів Котельникова-Хренова, Дахна, Натяглої – на 23,22–47,27 % ($P < 0,05 \dots P < 0,001$) [21].

Отримані результати досліджень дозволяють рекомендувати спосіб, де в якості флотанту використовують суміш розчинів кальцієвої селітри, цукру та кухонної солі, для ефективної зажиттєвої лабораторної діагностики стронгілідозів травного тракту у овець.

Висновки

Проведеними дослідженнями встановлено, що способи копроовоскопії із використанням випробуваних флотантів мають 100 %-ву чутливість щодо яєць стронгілід травного тракту під час лабораторної діагностики інвазованих овець. Разом з тим, найвищі показники інтенсивності стронгілідозної інвазії виявлено за використання способу, де в якості флотанту використано суміш розчинів кальцієвої селітри, цукру

та кухонної солі. Цей спосіб залежно від експозиції копропроб має вищу результативність порівняно зі способами, де в якості флотанту використано бішофіт – на 30,2–36,1 %, суміш розчинів кальцієвої та аміачної селітри – на 19,4–26,3 %, суміш розчинів цукру та кальцієвої селітри – на 8,8–19,5 %.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Автор заявляє, що проведені дослідження повністю відповідають загальноприйнятим нормам гуманного ставлення до тварин та принципам біоетики. Експериментальна частина роботи виконувалася з дотриманням вимог чинного законодавства України, зокрема Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», та Директиви ЄС 2010/63/EU про захист тварин, що використовуються для наукових цілей. Збір матеріалу (зразків фекалій) в умовах вівчарських господарств здійснювався неінвазивним шляхом під час природної дефекації тварин, що виключало нанесення травм, мінімізувало будь-які стресові або больові фактори та не порушувало звичних умов утримання овець.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автор стверджує про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання ІІІ та технологій на основі ІІІ

Автор заявляє, що не використовував штучний інтелект або технології на основі ІІІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. Olmedo-Juárez, A., Zarza-Albarran, M. A., Rojo-Rubio, R., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., Mondragón-Ancelmo, J., Rivero-Pérez, N., & Mendoza-de Gives, P. (2020). *Acacia farnesiana* pods (plant: Fabaceae) possesses anti-parasitic compounds against *Haemonchus contortus* in female lambs. *Experimental Parasitology*, 218, 107980. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107980>
2. Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1135–1152. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.008>
3. Zajíčková, M., Nguyen, L. T., Skálová, L., Raisová Stuchlíková, L., & Matoušková, P. (2020). Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. *Drug Discovery Today*, 25(2), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.007>
4. Walker, J. G., & Morgan, E. R. (2014). Generalists at the interface: Nematode transmission between wild and domestic ungulates. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.001>

5. White, L. A., Forester, J. D., & Craft, M. E. (2017). Dynamic, spatial models of parasite transmission in wildlife: Their structure, applications and remaining challenges. *Journal of Animal Ecology*, 87(3), 559–580. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12761>
6. Winter, J., Rehbein, S., & Joachim, A. (2018). Transmission of helminths between species of ruminants in Austria appears more likely to occur than generally assumed. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 30. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00030>
7. Côté, S. D., Rooney, T. P., Tremblay, J.-P., Dussault, C., & Waller, D. M. (2004). Ecological impacts of deer overabundance. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35(1), 113–147. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105725>
8. Skuce, P. J., Morgan, E. R., van Dijk, J., & Mitchell, M. (2013). Animal health aspects of adaptation to climate change: beating the heat and parasites in a warming Europe. *Animal*, 7, 333–345. <https://doi.org/10.1017/s175173111300075x>
9. Charlier, J., Rinaldi, L., Musella, V., Ploeger, H. W., Chartier, C., Vineer, H. R., Hinney, B., von Samson-Himmelstjerna, G., Băcescu, B., Mickiewicz, M., Mateus, T. L., Martinez-Valladares, M., Quealy, S., Azaizah, H., Sekovska, B., Akkari, H., Petkevicius, S., Hektoen, L., Höglund, J., Morgan, E. R., Bartley, D. J., & Claerebout, E. (2020). Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 182, 105103. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105103>
10. Rashid, M., Rashid, M. I., Akbar, H., Ahmad, H., Hassan, M. A., Ashraf, K., Saeed, K., & Gharbi, M. (2018). A systematic review on modelling approaches for economic losses studies caused by parasites and their associated diseases in cattle. *Parasitology*, 146(2), 129–141. <https://doi.org/10.1017/s0031182018001282>
11. Charlier, J., Höglund, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Dorny, P., & Vercruysse, J. (2009). Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: *Impact on production, diagnosis and control*. *Veterinary Parasitology*, 164(1), 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.012>
12. Almalaik, A. H. A., Bashar, A. E., & Abakar, A. D. (2008). Prevalence and dynamics of some gastrointestinal parasites of sheep and goats in Tulus area based on post-mortem examination. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(6), 390–399. <https://doi.org/10.3923/ajava.2008.390.399>
13. Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & Van Wyk, J. A. (2016). The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Advances in Parasitology*, 93, 95–143. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.022>
14. Torres-Acosta, J. F. J., & Hoste, H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 77(2-3), 159–173. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.03.009>
15. Mohammed, N., Taye, M., Asha, A., & Sheferaw, D. (2014). Epizootological study of small ruminant gastrointestinal strongyles in Gamo-Gofa Zone, Southern Ethiopia. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(2), 469–474. <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0528-1>
16. Nielsen, M. K. (2021). Parasite faecal egg counts in equine veterinary practice. *Equine Veterinary Education*, 34(11), 584–591. <https://doi.org/10.1111/eve.13548>
17. Bryan, R. P., & Kerr, J. D. (1989). The relation between the natural worm burden of steers and the faecal egg count differentiated to species. *Veterinary Parasitology*, 30(4), 327–334. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(89\)90102-7](https://doi.org/10.1016/0304-4017(89)90102-7)
18. Teixeira, W. F. P., Gomes, L. V. C., Felippelli, G., Buzzulini, C., Zapa, D. M. B., Cavalcante, A. S. d. A., Borges, D. G. L., Ferreira, L. L., Santos, T. R. d., Soares, V. E., Arnhold, E., Costa, A. J. d., Borges, F. d. A., & Lopes, W. D. Z. (2021). Investigation of fecal egg counts versus worm burden and helminth fauna in cattle treated or not with macrocyclic lactones in a tropical region. *Veterinary Parasitology*, 300, 109618. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109618>
19. Eysker, M., & Ploeger, H. W. (2000). Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology*, 120(7), 109–119. <https://doi.org/10.1017/s0031182099005752>
20. Dakhno, I. S., & Dakhno, Yu. I. (2010). *Ekolohichna helmintolohiia* [Ecological helminthology]. *Navchalniy posibnyk*. Kozatskyi val, VAT “SOD” (in Ukrainian)
21. Sorokova, S. S. (2019). Comparative effectiveness of the methods of coproovoscopic diagnosing sheep strongyloidosis. *Scientific Progress & Innovations*, 3, 146–151. <https://doi.org/10.31210/visnyk2019.03.19>
22. Starodub, Ye. S. (2019). Improving coproovoscopic diagnostics of trichostrongylosis of geese. *Scientific Progress & Innovations*, 1, 222–226. <https://doi.org/10.31210/visnyk2019.01.26>
23. Petrenko, M. (2023). Effectiveness of the improved method of lifelong diagnostics trichurosis of sheep. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 6(3), 13–16. <https://doi.org/10.32718/ujvas6-3.03>

ORCID

O. Natiahyi 

<https://orcid.org/0009-0004-4275-0173>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Potency of a commercial inactivated trivalent foot-and-mouth disease vaccine in local goats of the Diyala Governorate, Iraq

A. H. Al-Zuhairi✉

Article info

Correspondence Author
A. H. Al-ZuhairiE-mail:
ahmed.h@uodiyala.edu.iqCollege of Veterinary
Medicine, University of
Diyala,
Al-Muradia, Old Baghdad-
Baqubah Road, Baqubah,
32001, Diyala, Iraq

Citation: Al-Zuhairi, A. H. (2026). Potency of a commercial inactivated trivalent foot-and-mouth disease vaccine in local goats of the Diyala Governorate, Iraq. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 65–69. doi: 10.31210/spi2026.29.02.10

Foot-and-Mouth Disease remains one of the most economically devastating infections affecting livestock producers globally. This study evaluated the immunogenicity and field efficacy of a commercial inactivated trivalent vaccine containing serotypes O, A, and Asia-1 in the local goat population of the Diyala Governorate, Iraq, focusing on assessing how host sex and pregnancy status modulate the resulting humoral immune response. A total of 178 clinically healthy local breed goats, comprising 100 females and 78 males aged between 7 and 36 months, were immunized with a single 1 mL dose administered subcutaneously. Paired blood samples were collected immediately before vaccination (Day 0) and at Day 28 post-vaccination to capture peak antibody synthesis. Serological analysis was performed using a commercial solid-phase competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit, with antibody levels expressed as percentage inhibition, where a threshold of greater than or equal to 50 % was defined as protective immunity. Evaluation of baseline samples revealed a pre-vaccination seropositivity rate of 15.2 % (27/178), confirming that the virus is endemic to the region. Following immunization, the overall protective seropositivity rate increased significantly to 89.3 % (159/178) by Day 28 ($p < 0.001$), and the mean percentage inhibition values more than doubled across all three viral strains. Host sex exerted no statistically significant influence on vaccine responsiveness ($p = 0.541$), yielding comparable seropositivity rates of 87.2 % for male and 90.8 % for female cohorts. Conversely, pregnancy status imposed a substantial physiological limitation on vaccine-induced immunogenicity. Pregnant goats exhibited a significantly lower protective seropositivity rate of 82.1 % compared to 97.3 % in non-pregnant animals ($p = 0.026$). Furthermore, gestation significantly suppressed antibody synthesis levels for serotypes O ($p = 0.001$) and Asia-1 ($p = 0.002$). In conclusion, while the commercial trivalent vaccine is safe and highly potent, pregnancy-induced immunosuppression significantly reduces its protective efficacy. These findings suggest that small ruminants must be integrated into national control programs, and vaccination campaigns should be strategically timed during non-pregnant phases, such as the early dry period or prior to the breeding season, to optimize herd immunity.

Keywords: vaccine potency, goats, enzyme-linked immunosorbent assay, pregnancy, immunity, Foot-and-Mouth Disease.

Ефективність комерційної інактивованої тривалентної вакцини проти ящуру у місцевих кіз провінції Діяла, Ірак

А. Х. Аль-Зухайрі

Факультет ветеринарної
медицини, Університет
Діяли,
м. Баакуба, Ірак

Ящур залишається однією з найбільш економічно збиткових інфекцій, що завдає збитків виробникам тваринницької продукції в усьому світі. У цьому дослідженні оцінено імуногенність та ефективність комерційної інактивованої тривалентної вакцини, що містить серотипи О, А та Asia-1, на місцевій популяції кіз у провінції Діяла, Ірак. Основну увагу приділено аналізу того, як стать і стан вагітності тварин модулюють поствакцинальну імунну відповідь. Загалом 178 клінічно здорових кіз місцевої породи (100 самок і 78 самців віком від 7 до 36 місяців) імунізували одноразовою дозою об'ємом 1 мл підшкірно. Парні зразки крові відбирали безпосередньо перед вакцинацією (день 0) та на 28-й день після неї для фіксації піку синтезу антитіл. Серологічний аналіз проводили з використанням комерційного набору для твердофазного імуноферментного аналізу, а рівень антитіл виражали у відсотках інгібіції, де захисним порогом вважали показник вище або рівний 50 %. Оцінка вихідних зразків виявила початковий рівень серопозитивності 15,2 % (27/178), що підтверджує ендемічність вірусу в регіоні. Після імунізації загальний показник захисної серопозитивності суттєво зріс до 89,3 % (159/178) на 28-й день ($p < 0,001$), а середні значення відсотка інгібіції зросли більш ніж удвічі для всіх трьох вірусних штамів. Стать тварин не чинила статистично значущого впливу на реактивність вакцини ($p = 0,541$), демонструючи зіставні рівні серопозитивності: 87,2 % у самців та 90,8 % у самок. Навпаки, стан вагітності накладав суттєві фізіологічні обмеження на вакциноіндуковану імуногенність. Кітні кози мали значно нижчий рівень захисної серопозитивності – 82,1 % порівняно з 97,3 % у кітних тварин ($p = 0,026$). Крім того, кітність суттєво пригнічувала рівень синтезу антитіл до серотипів О ($p = 0,001$) та Asia-1 ($p = 0,002$). Хоча комерційна тривалентна вакцина є безпечною та висококонкурентною, викликана кітністю кіз імуносупресія суттєво знижує її захисну ефективність. Отримані результати свідчать про необхідність інтеграції дрібних жуйних тварин до національних програм контролю, а кампанії з вакцинації слід стратегічно планувати на невагітні фази репродуктивного циклу, такі як ранній сухостійний період або період безпосередньо перед початком сезону парування, для оптимізації популяційного імунітету.

Ключові слова: ефективність вакцини, кози, імуноферментний аналіз, кітність, імунітет, ящур.



Бібліографічний опис для цитування: Аль-Зухайрі А. Х. Ефективність комерційної інактивованої тривалентної вакцини проти ящуру у місцевих кіз провінції Діяла, Ірак. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 65–69.

Introduction

Among various livestock diseases, Foot-and-Mouth Disease (FMD) remains one of the most economically devastating for livestock producers. FMD is caused by the FMD virus (FMDV), a member of the *Picornaviridae* family, which targets cloven-hoofed animals [1]. FMDV comprises seven immunologically distinct serotypes that are highly mutable, which significantly aggravates disease control [2]. Because immune responses induced by vaccination are not cross-protective between different strains, vaccine formulations used in FMD vaccination campaigns are based on BEI-inactivated viral particles and usually contain more than one virus strain [3].

In Iraq, serotype A was officially recorded for the first time in 1952, followed by Asia-1 and serotype O in later years [4]. Disease control measures currently applicable in Iraq focus on mass vaccination using inactivated FMDV serotypes O, A, and Asia-1 [5]. Evaluating immunological control and the field response to these inactivated FMD vaccines is vital. The World Organisation for Animal Health sets the benchmark for control measures based on the PD₅₀ (50 % Protective Dose) test [6]. Generally, the Solid-Phase Competitive ELISA (SPCE) serological method and a >50 % inhibition concentration (%IH) value [7] for neutralizing antibodies are used to determine the correlation and efficacy of protective vaccines [8, 9]. The standard control threshold is set at a 50 % SPCE inhibition level.

Most FMD control programs view cattle as the primary targets. However, small ruminants, such as sheep and goats, also play a critical role in FMD epidemiology. These animals can act as maintenance hosts, showing mild or subclinical signs while efficiently spreading the virus [10]. Despite their importance, literature reporting the outcomes of vaccination in goats, especially under unique physiological conditions, remains limited.

Immunological factors, such as sex and pregnancy, are important in modulating the immune response but are often overlooked during field vaccination campaigns [11]. During pregnancy, immunological tolerance is enhanced to allow gestation to progress without the maternal immune system rejecting the fetus. This physiological shift can potentially impede the host's response to vaccination [12].

Iraq imports vaccines from various global sources. While these imported formulations consistently pass standard quality control benchmarks, their real-world field performance in the local small ruminant population requires continuous evaluation.

The aim of the study

The aim of this study was to evaluate the immune responsiveness of goats in the Diyala Governorate to a commercial trivalent FMD vaccine and to assess the impact of sex and pregnancy status on the resulting immune response.

Materials and methods

Study Area, Animals, and Design

The research was conducted in the Diyala Governorate, an agricultural region in eastern Iraq. For this cross-sectional study, a geographical spread was achieved by randomly selecting 178 local breed goats from six smallholder farms in Al-Muqdadiya. The sample included 100 females and 78 males aged between 7 and 36 months. All animals were clinically healthy and had not been vaccinated against FMD for at least six months prior to the study. The experimental design involved mass vaccination followed by paired serological sampling.

Vaccine and Vaccination Protocol

A commercially available, inactivated, oil-adjuvanted, trivalent FMD vaccine containing serotypes O, A, and Asia-1 was used. The vaccine was stored appropriately at 4 °C. Each goat received a single 1 mL dose administered subcutaneously in the neck region.

Sample Collection

Blood samples (5 mL) were collected from the jugular vein into plain vacutainer tubes immediately before vaccination (baseline sample, Day 0) and at Day 28 post-vaccination (to capture the peak antibody response). Serum separation was performed by centrifuging the samples for 15 minutes at 3,000 × g. The collected sera were then aliquoted and stored frozen at -20 °C until analysis.

FMD Serology

Serological analysis was performed using a commercial ELISA kit (PrioCHECK™ FMDV Type O/A/Asia-1 antibody ELISA, Thermo Fisher Scientific) in strict accordance with the manufacturer's instructions. This assay is a prescribed test for FMD seromonitoring according to the World Organisation for Animal Health (WOAH) guidelines. The test operates on the principle of competitive binding to an FMDV antigen-coated plate. The results were calculated using the percentage inhibition (%IH) formula:

$$\%IH = \left[1 - \left(\frac{OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{negative control}}} \right) \right] \times 100$$

Any sample recording a %IH ≥ 50 % was considered positive for protective antibodies.

Statistical Analysis

Data analysis was conducted using GraphPad Prism software (version 9.5.1). The Shapiro-Wilk test was applied to assess data normality. Chi-square tests (χ^2) were used to determine the statistical significance of categorical data (seropositivity rates). For continuous data (mean %IH) from two related groups (Day 0 vs. Day 28), a paired t-test was utilized. Unpaired t-tests were used to compare two independent groups (male vs. female, pregnant vs. non-pregnant). A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results and discussion

Clinical observations and vaccine safety

The observation period lasted for 72 hours post-vaccination for all animals. Only mild, transient swelling was noted at the injection site in some goats; this local reaction completely resolved within 48 hours without any medical treatment. These observations indicate a favorable safety profile of the commercial vaccine under field conditions.

Overall seropositivity and antibody response

Evaluation of baseline immunity showed that prior to vaccination, 15.2 % (27/178) of the goats were seropositive, indicating previous FMDV exposure. Following vaccination, the overall seropositivity rate increased significantly to 89.3 % (159/178), demonstrating a robust immune response ($\chi^2=125.6$, $p<0.001$).

The detailed dynamics of seroconversion and antibody levels for each specific serotype are summarized in [Table 1](#).

Table 1

Overall seroconversion (count, %) and mean antibody response (mean %IH $\pm$ SD) in goats (n=178)

Parameter	Pre-vaccination (Day 0)	Post-vaccination (Day 28)	p-value
Seropositivity rate	15.2 % (27/178)	89.3 % (159/178)	< 0.001 (χ^2 test)
Serotype O	32.1 $\pm$ 11.5	78.4 $\pm$ 9.8	< 0.001 (Paired <i>t</i> -test)
Serotype A	28.5 $\pm$ 13.2	72.1 $\pm$ 11.3	< 0.001 (Paired <i>t</i> -test)
Serotype Asia-1	30.8 $\pm$ 10.9	75.9 $\pm$ 10.5	< 0.001 (Paired <i>t</i> -test)

As shown in [Table 1](#), the mean percentage inhibition values for all three evaluated serotypes showed a highly significant increase from baseline to post-vaccination levels. Following immunization, a substantial growth in antibody levels was observed across all strains. The highest relative increase in antibody response was recorded for serotype A, which demonstrated a 2.53-fold growth compared to its baseline level ($p<0.001$). A similar pronounced expansion was also captured for serotypes Asia-1 ($p<0.001$) and O ($p<0.001$), which increased by 2.46-fold and 2.44-fold, respectively. These findings demonstrate that the commercial trivalent vaccine induces a robust and balanced humoral immune response, actively stimulating antibody production against all three viral serotypes within the local goat population.

Influence of sex on immune response

To optimize research resources and diagnostic kit utilization, a representative sub-sampling approach was employed, selecting a cohort of 120 goats (55 males and 65 females) for serological evaluation. Analysis of the post-vaccination parameters demonstrated that both subgroups achieved high levels of protective antibodies by Day 28. The comparative breakdown of seropositivity rates and mean antibody levels between the sexes is presented in [Table 2](#).

Table 2

Post-vaccination immune response (mean %IH $\pm$ SD) in male and female goats (total n = 120, selected from a herd of 178 animals)

Parameter	Male goats (n = 55)	Female goats (n = 65)	p-value
Seropositivity rate	87.2 % (48/55)	90.8 % (59/65)	0.541 (χ^2 test)
Serotype O	77.6 $\pm$ 10.2	79.1 $\pm$ 9.5	0.403 (Unpaired <i>t</i> -test)
Serotype A	71.3 $\pm$ 11.8	72.8 $\pm$ 10.9	0.471 (Unpaired <i>t</i> -test)
Serotype Asia-1	75.2 $\pm$ 11.0	76.5 $\pm$ 10.1	0.503 (Unpaired <i>t</i> -test)

As shown in [Table 2](#), statistical analysis confirmed that host sex did not exert a significant influence on vaccine-induced humoral protection. The minor variations observed in seropositivity rates between the male and female cohorts lacked statistical significance ($p=0.541$). Similarly, the mean percentage inhibition values across all three evaluated viral strains remained highly comparable between the groups, with no statistically verifiable deviations detected for serotypes O ($p = 0.403$), A ($p = 0.471$), or Asia-1 ($p = 0.503$). These results indicate that the commercial trivalent vaccine provides uniform immunological protection in goats regardless of sex.

Influence of pregnancy on immune response

To further investigate internal physiological modulations, the female cohort (n = 65) was stratified by gestation status into pregnant (n = 28) and non-pregnant (n = 37) subgroups. The comparative data regarding the impact of pregnancy on the vaccine's immunogenicity are summarized in [Table 3](#).

Table 3

Post-vaccination immune response (mean %IH $\pm$ SD) in female goats by pregnancy status (total n = 65)

Parameter	Pregnant goats (n = 28)	Non-pregnant goats (n = 37)	p-value
Seropositivity rate	82.1 % (23/28)	97.3 % (36/37)	0.026 (χ^2 test)
Serotype O	74.8 $\pm$ 10.5	82.3 $\pm$ 7.1	0.001 (Unpaired <i>t</i> -test)
Serotype A	68.9 $\pm$ 11.8	75.6 $\pm$ 9.2	0.051 (Unpaired <i>t</i> -test)
Serotype Asia-1	72.1 $\pm$ 10.8	79.7 $\pm$ 8.3	0.002 (Unpaired <i>t</i> -test)

As shown in [Table 3](#), physiological status significantly affected the host's immune responsiveness. Non-pregnant animals exhibited a highly pronounced seropositivity rate compared to the pregnant group ($p=0.026$). Furthermore, pregnancy status significantly suppressed antibody production levels. For serotypes O and Asia-1, non-pregnant goats achieved a highly significant expansion in antibody levels ($p=0.001$ and $p=0.002$, respectively) compared to their pregnant counterparts. A similar downward trend was observed for serotype A, though it marginally missed the traditional statistical significance threshold ($p=0.051$).

This study emphasizes the significance of the physiological status of animals, contributes to the ongoing research on Foot-and-Mouth Disease (FMD) vaccination, and documents its field application in goats in Iraq. The overall seroconversion rate of 89.3 % and the substantial increases in the percentage inhibition (%IH) values during the post-vaccination period confirm the high immunogenicity of the vaccine, as highlighted in the World Organisation for Animal Health (WOAH) reference documents and by other authors [9]. The baseline figures pertaining to FMDV diagnostics, which revealed that 15.2 % of the animals were seropositive pre-vaccination, indicate that FMDV remains endemic to the Diyala region. These data point to the critical importance of vaccinating small ruminants, which frequently serve as viral reservoirs [4, 11].

As pointed out in the FAO-UN monthly report on FMD status in 2016, Iraq is included in the Middle East and West Eurasia epidemiological zone according to its geographical location. This region shares environmental similarities with ecosystems characterized by high virus circulation, where FMDV serotypes O, A, and Asia-1 traditionally dominate [13, 14]. Consequently, there must be continuous tracking of circulating FMD virus serotypes to systematically evaluate and select the most suitable vaccine formulations, rather than relying strictly on historical data or previously dominant serotypes distributed in the area [15].

One of the more notable findings of this research was the lack of a significant difference between the sexes regarding their immune response to the vaccine. This is evidenced by the highly comparable post-vaccination seropositivity rates of 87.2 % in males and 90.8 % in females ($p=0.541$). This demonstrates that both the vaccine antigen and the adjuvant system are robust enough to effectively activate the immune systems of both male and female goats, eliciting uniform mean percentage inhibition values across all tested strains ($p>0.05$). This outcome is highly valuable for field applications, as it streamlines the mass vaccination process and removes the practical need for any sex-based vaccination protocols.

The most important finding from this study remains the diminished antibody response observed in pregnant goats. This phenomenon is attributed to the immunosuppressive tendencies associated with pregnancy, which are well-documented in other species and closely tied to high levels of progesterone and cortisol that promote a T-helper 2 (Th2) immune response. This physiological shift centers around fostering maternal immune tolerance [12, 15] in order to preserve the pregnancy. However, in doing so, it can significantly limit the mother's response to novel antigens, such as those present in a vaccine. This mechanism explains the lower post-vaccination seropositivity rate (82.1 % vs. 97.3 %, $p=0.026$) and suppressed mean %IH values for serotypes O ($p=0.001$) and Asia-1 ($p=0.002$) found in our pregnant cohort.

Our findings are in line with recent research in livestock indicating reduced immunogenicity of several other pregnancy-associated vaccines [11, 16]. This factor is critical in terms of disease control. Kids born to vaccinated mothers depend entirely on transferred

colostral antibodies for immunological protection during their early days of life. If the maternal response to vaccination is insufficient, these kids will ingest inadequate passive immunity through the colostrum. Thus, while field observations confirm it is safe to vaccinate goats during pregnancy, the procedure is unlikely to provide the desired epidemiological benefits for the offspring.

A limitation of this study is the measurement of humoral immunity at a single peak timepoint (Day 28). Future longitudinal studies tracking antibody persistence in pregnant versus non-pregnant animals are highly required. Additionally, the parallel assessment of cell-mediated immunity would help in obtaining a more comprehensive picture of the complex immune modulation that occurs during pregnancy [17].

The inactivated trivalent FMD vaccine is highly effective in goats, with both sexes responding equally. However, pregnancy significantly limits antibody production and reduces protective immunity rates. Therefore, animal physiological status must be considered to optimize vaccination timing.

Based on these findings, the following control measures are recommended:

Inclusion of Small Ruminants: formally integrate sheep and goats into national FMD programs to build herd immunity and break the transmission cycle.

Strategic Timing: schedule immunization during non-pregnant phases, preferably during the early dry period or just before breeding [18–21], to maximize host immune response [16].

Booster Evaluation: assess whether pregnancy booster doses can elevate maternal antibody titers and enhance passive colostrum immunity for newborns.

Active Surveillance: maintain continuous virological monitoring to ensure precise antigenic matching between imported vaccine strains and circulating field variants.

Conclusions

The inactivated trivalent FMD vaccine demonstrated high immunogenicity in the local goat population, driving a significant increase in the overall seropositivity rate from a baseline of 15.2 % (27/178) to 89.3 % (159/178) by Day 28 post-vaccination ($p<0.001$). Following immunization, mean %IH values more than doubled across all strains, showing a highly significant 2.53-fold growth for serotype A, 2.46-fold for serotype Asia-1, and 2.44-fold for serotype O ($p<0.001$). Host sex does not exert a statistically significant influence on vaccine efficacy ($p=0.541$), yielding highly comparable protective antibody levels and final seropositivity rates of 87.2 % (48/55) for male and 90.8 % (59/65) for female goats. Conversely, pregnancy imposes a substantial physiological limitation on vaccine responsiveness, resulting in a significantly lower protective seropositivity rate of 82.1 % (23/28) in pregnant goats compared to 97.3 % (36/37) in non-pregnant counterparts ($p=0.026$). Gestation significantly suppresses antibody levels for serotypes O ($p=0.001$) and Asia-1 ($p=0.002$), with a similar downward trend captured for serotype A ($p=0.051$), confirming that animals should ideally be vaccinated during non-pregnant phases.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The authors declare that the conducted studies fully comply with generally accepted norms of humane treatment of animals and the principles of bioethics. Ethical approval was officially granted by the Bioethics Committee of the Department of Internal and Preventive Medicine at the College of Veterinary Medicine, University of Diyala, Iraq (Protocol No. 22 dated 03.09.2025). To minimize animal stress and discomfort, all handling, restriction, and blood sampling procedures were performed in strict accordance with standard veterinary guidelines and current international principles of animal welfare.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The author states that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The author expresses sincere gratitude to everyone who contributed to this research and supported the completion of this study.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The author declares that no generative AI or AI-assisted technologies were used during the preparation, writing, translation, or language polishing of this manuscript. The final content was fully authored and reviewed by the researcher, who takes sole responsibility for the work.

References

1. Grubman, M. J., & Baxt, B. (2004). Foot-and-mouth disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 465–493. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.2.465-493.2004>
2. Domingo, E., Pariente, N., Airaksinen, A., González-López, C., Sierra, S., Herrera, M., Grande-Pérez, A., Lowenstein, P. R., Manrubia, S. C., Lázaro, E., & Escarmis, C. (2005). Foot-and-mouth disease virus evolution: Exploring pathways towards virus extinction. In B. W. Mahy (Ed.), *Foot-and-Mouth Disease Virus* (pp. 149–173). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-27109-0_7
3. Doel, T. R. (2003). FMD vaccines. *Virus Research*, 91(1), 81–99. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(02\)00261-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00261-7)
4. Al-Salihi, K. A. (2019). The epidemiology of foot-and-mouth disease outbreaks and its history in Iraq. *Veterinary World*, 12(5), 706–712. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.706-712>
5. Knight-Jones, T. J. D., & Rushton, J. (2013). The economic impacts of foot and mouth disease – What are they, how big are they and where do they occur? *Preventive Veterinary Medicine*, 112(3–4), 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.07.013>
6. World Organisation for Animal Health. (2023). Foot and mouth disease (Chapter 3.1.8). In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. <https://www.woah.org>
7. Paiba, G. A., Anderson, J., Paton, D. J., Soldan, A. W., Alexandersen, S., Corteyn, M., Wilsden, G., Hamblin, P., MacKay, D. K. J., & Donaldson, A. I. (2004). Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). *Journal of Virological Methods*, 115(2), 145–158. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.09.016>
8. Mackay, D. K. J., Forsyth, M. A., Davies, P. R., Berlinzani, A., Belsham, G. J., Flint, M., & Ryan, M. D. (1998). Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, 16(5), 446–459. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00227-2)
9. Hamblin, C., Kitching, R. P., Donaldson, A. I., Crowther, J. R., & Barnett, I. T. R. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus: III. Evaluation of antibodies after infection and vaccination. *Epidemiology and Infection*, 99(3), 733–744. <https://doi.org/10.1017/s0950268800066590>
10. Stenfeldt, C., Eschbaumer, M., Humphreys, J., Medina, G. N., & Arzt, J. (2025). The pathogenesis of foot-and-mouth disease virus: current understandings and knowledge gaps. *Veterinary Research*, 56(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13567-025-01545-5>
11. Mahmoud, M. A. E.-F., Ghazy, A. A., & Shaapan, R. M. (2018). Diagnosis and control of foot and mouth disease (FMD) in dairy small ruminants; sheep and goats. *International Journal of Dairy Science*, 14(1), 45–52. <https://doi.org/10.3923/ijds.2019.45.52>
12. Robinson, D. P., & Klein, S. L. (2012). Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Hormones and Behavior*, 62(3), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.023>
13. Jamal, S. M., & Belsham, G. J. (2013). Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Veterinary Research*, 44(1), 116. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-116>
14. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016, September). *Foot-and-mouth disease situation* (Monthly Report). (D. King, Ed.). WRLFMD; Pirbright. https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/eufmd/docs/FMD_monthly_reports/2016/Sept2016.pdf
15. Ott, T. L., & Gifford, C. A. (2010). Effects of early conceptus signals on circulating immune cells: Lessons from domestic ruminants. *American Journal of Reproductive Immunology*, 64(4), 245–254. Portico. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00912.x>
16. Chambers, M. A., Graham, S. P., & La Ragione, R. M. (2016). Challenges in veterinary vaccine development and immunization. In S. Thomas (Ed.), *Vaccine design: Methods and protocols* (pp. 3–35). Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3389-1_1
17. Niewiesk, S. (2014). Maternal antibodies: Clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Frontiers in Immunology*, 5, 446. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00446>
18. Schat, K. A. (2014). Vaccines and vaccination practices: Key to sustainable animal production. In N. K. Van Alfen (Ed.), *Encyclopedia of agriculture and food systems* (pp. 315–332). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52512-3.00189-3>
19. Lacasta, D., Ferrer, L. M., Ramos, J. J., González, J. M., Ortín, A., & Fthenakis, G. C. (2015). Vaccination schedules in small ruminant farms. *Veterinary Microbiology*, 181(1–2), 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.018>
20. Garcia-Pintos, C., Riet-Correa, F., & Menchaca, A. (2021). Effect of Foot-and-mouth disease vaccine on pregnancy failure in beef cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 761304. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.761304>
21. Kim, D., Moon, J., Ha, J., Kim, D., & Yi, J. (2021). Effect of foot-and-mouth disease vaccination on acute phase immune response and anovulation in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*). *Vaccines*, 9(5), 419. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050419>

ORCID

A. H. Al-Zuhairi 

<https://orcid.org/0000-0002-1224-0154>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Methodical approaches to cranoscopic study of purebred Arabian horses in the context of forensic veterinary examination

I. Yatsenko^{1,6} | R. S. K. Abuznaid² | V. Binkevych³ | I. Biben⁴ | L. Savchuk⁵ | V. Dobrovolskyi⁵ | N. Kravchenko⁶

Article info

Correspondence Author

I. Yatsenko

E-mail:

yatsenko-1971@ukr.net

¹ National Scientific Center "Hon. Prof. M. S. Bokarius Forensic Science Institute", 8-a Zolochivska Str., Kharkiv, 61177, Ukraine² Palestine Polytechnic University, Wadi al-Hariya Str., Hebron, P700, Palestine³ Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, 50 Pekarska Str., Lviv, 79010, Ukraine⁴ Dnipro State Agrarian and Economic University, 25 Serhii Yefremov Str., Dnipro, 49000, Ukraine⁵ Higher education institution "Podilskyi State University", Kamianets-Podilskyi, 12 Shevchenko Str., 32301, Ukraine⁶ State Biotechnological University, 44 Alchevskykh Str., Kharkiv, 61002, Ukraine**Citation:** Yatsenko, I., Abuznaid, R. S. K., Binkevych, V., Biben, I., Savchuk, L., Dobrovolskyi, V., & Kravchenko, N. (2026). Methodical approaches to cranoscopic study of purebred Arabian horses in the context of forensic veterinary examination. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 70–77. doi: 10.31210/spi2026.29.02.11

The aim of the study is to formulate and substantiate methodological approaches to the osteoscopic examination of the nasocranial part of the skull of purebred Arabian horses in the context of forensic veterinary expertise. The informativeness of osteological examination parameters (osteoscopy) of the nasocranial region of the skull of purebred Arabian horses was analyzed. The study was conducted on 36 dry skulls of purebred Arabian horses obtained from veterinary anatomical collections and verified according to breeding documentation. The skulls were selected based on preservation criteria, which included the absence of postmortem damage, deformation, or pathological changes that could affect morphometric analysis. Cranial reference points were identified and their localization was described. It was established that the skull is an informative material for determining the age and sex of animals and can serve as a basis for the development of computer-based technologies for expert examinations. The skulls were obtained from horses aged from 1 day to 5 years. The age dependence of cranial measurements was determined on 60 skulls of Arabian horses. Thus, the study presents a comprehensive approach to the osteoscopic analysis of the nasomaxillary region of the skull of purebred Arabian horses, emphasizing its practical application in forensic veterinary examination of cranial material. Visual anatomical assessment of horse skulls allows for determining the sex and age of unidentified remains. It is noted that the identified cranial landmarks, particularly those associated with the frontal and nasal bones, demonstrate stable sexual dimorphism and age-related variability, confirming their high diagnostic value in forensic veterinary examinations. The proposed innovative developments will form the basis of standardized protocols aimed at improving the scientific accuracy and efficiency of cranial forensic veterinary investigations, especially for animal identification and estimation of the postmortem interval. The study confirms the growing role of forensic veterinary expertise in the legal and ethical assessment of animal welfare. Further research should focus on expanding applications to other horse breeds and integrating modern imaging methods to enhance the accuracy of expert conclusions.

Keywords: forensic veterinary expertise, purebred Arabian horses, skull, methodology, osteology, craniology, cranoscopy.

Методологічні підходи до краніоскопічного дослідження чистокровних арабських коней у контексті судово-ветеринарної експертизи

I. Яценко^{1,6} | Р. С. К. Абузнайд² | В. Бінкевич³ | І. Бібен⁴ | Л. Савчук⁵ | В. Добровольський⁵ | Н. Кравченко⁶¹ Національний науковий центр «Інститут судових експертиз ім. Засл. професора М. С. Бокаріуса», м. Харків, Україна² Палестинський політехнічний університет, м. Хеврон, Палестина³ Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна⁴ Дніпровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпро, Україна⁵ Заклад вищої освіти «Подільський державний університет», м. Кам'янець-Подільський, Україна⁶ Державний біотехнологічний університет, м. Харків, Україна

Метою роботи є формулювання та обґрунтування методологічних підходів до остеоскопічного дослідження носокраніальної частини черепа чистокровних арабських коней у контексті судово-ветеринарної експертизи. Проаналізовано інформативність параметрів остеологічного дослідження (остеоскопії) носокраніального відділу черепа чистокровних арабських коней. Дослідження проведено на 36 сухих черепах чистокровних арабських коней, отриманих із ветеринарно-анатомічних колекцій та верифікованих за плеємною документацією. Черепи відбирали за критеріями збереженості, що передбачали відсутність посмертних пошкоджень, деформацій або патологічних змін, які могли б вплинути на морфометричний аналіз. Визначено краніологічні орієнтири та описано їхню локалізацію. Встановлено, що череп є інформативним матеріалом для визначення віку та статі тварин і може бути основою для розроблення комп'ютерних технологій експертних досліджень. Черепи отримано від коней віком від 1 доби до 5 років. Вікову залежність краніологічних вимірів визначено на 60 черепах арабських коней. Отже, дослідження репрезентує комплексний підхід до остеоскопічного аналізу носомозкового відділу черепа чистокровних арабських коней з акцентом на його практичному застосуванні у судово-ветеринарній експертизі краніологічного матеріалу. Візуальна анатомічна оцінка черепа коней дає змогу визначати стать і вік невстановлених решток коней. Звертається увага на те, що виявлені краніологічні орієнтири, зокрема пов'язані з лобовими та носовими кістками, демонструють стабільний статевий диморфізм і вікову мінливість, що підтверджує їхню високу інформативність під час судово-ветеринарних експертиз. Запропоновані інноваційні розробки стануть основою стандартизованих протоколів, спрямованих на підвищення наукової точності та ефективності краніологічних судово-ветеринарних досліджень, особливо для ідентифікації тварин і визначення післясмертного інтервалу. Дослідження підтверджує зростаючу роль судово-ветеринарної експертизи у правовій та етичній оцінці добробуту тварин. Подальші дослідження доцільно спрямувати на розширення застосування до інших порід коней та інтеграцію сучасних методів візуалізації для підвищення точності експертних висновків.

Ключові слова: судово-ветеринарна експертиза, чистокровні арабські коні, череп, методологія, остеологія, краніологія, краніоскопія.

Бібліографічний опис для цитування: Яценко І., Абузнайд Р. С. К., Бінкевич В., Бібен І., Савчук Л., Добровольський В., Кравченко Н. Методологічні підходи до краніоскопічного дослідження чистокровних арабських коней у контексті судово-ветеринарної експертизи. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 70–77.

Introduction

Osteology, as a branch of morphology, is an indispensable tool for studying the origin and evolutionary development of animals, understanding their adaptive traits [5]; predicting productivity, diagnosing diseases, evaluating and analyzing the effectiveness of treatment measures; and in forensic veterinary examinations: determining taxonomic classification, identifying the sex and age of animals [2], detecting the presence or absence of pathological changes in the animal's body during life, estimating the time of death or the duration of corpse exposure to environmental conditions [3], identifying fatal injuries [4, 5], as well as hidden injuries [6]; bodily harm, which allows for objective documentation of factual data regarding offenses committed against the health and life of an animal [7, 8, 9]. Moreover, the processes of rearing, processing, and selling livestock products are often accompanied by violations such as product adulteration, poaching, theft, and slaughtering of animals for meat [10, 11, 12]. Therefore, for diagnostic osteological studies, priority should be given to determining the species, sex, and age of slaughtered animals based on their body parts-especially those of low commercial value, such as distal limb segments, the head, tail, etc.-left near the scene of the crime [13, 14].

The skeleton is the most informative structure for diagnostics, allowing for the identification of animal injuries not only in fresh cases of death or slaughter but even after a significant period of time [15]. Thus, solving the issues of determining the age and sex of animals based on skeletal bones is one of the few scientific directions in morphology and forensic veterinary science whose results are applied in determining the characteristics of an animal's body from its individual parts [16].

Forensic veterinary examinations increasingly rely on osteometric and osteoscopic analyses to solve issues related to unidentified animal remains, particularly in cases of decomposed, skeletonized, or dismembered animal corpses [17].

However, there is still a lack of clearly defined and scientifically grounded methodological recommendations, especially regarding productive animals. Therefore, the development of such methodologies should be based not only on certain macroscopic age-related criteria of an animal's skeleton but also on the knowledge of variability in osteometric, radiographic, microstructural, spectroscopic, and other parameters across a broad age and sex range.

Among the variety of biological material, the skull is the most informative for forensic veterinary examination and morphology. The issue of forensic veterinary craniology is a central focus for morphologists and forensic veterinary experts. The method for determining age and sex using craniometric indices in cattle for forensic veterinary purposes was first developed by Abuznaid [18]; the applied anatomy of the Arabian horse's skull was substantiated by Goodarzi et al. [19] and Pompermayer et al. [20]; a pilot study of horse and donkey skulls was demonstrated by Merkies et al. [21]; covariance (modularity) levels between components of the horse skull structure were studied by Parés-Casanova [22];

comparison of the back profiles of donkeys, ponies, and horses, as well as head shapes using geometric morphometry, was illustrated by Maško et al. [23]; geometric morphometric methods to visualize skull shape differences in horses of different ages were applied by Liuti et al. [24]; 3D cephalometric comparisons using CT scanning between straight-lined Egyptian Arabian and Thoroughbred horses were conducted by Alshami et al. [25] (2024); geometric morphometry of the facial profile of various horse breeds, including Arabians, was discussed by Alhaddad et al. [26]. However, researchers have not only focused on horse skulls. Studies have also investigated the morphological features of skulls in other animal species: Jashari et al. [27] used morphometric analysis to determine the sex of dog skulls; Gündemir et al. [28] established morphometric parameters for skulls of indigenous sheep breeds; Çakar et al. [29] compared morphometric skull characteristics of Simmental and Holstein cattle breeds; Gündemir et al. [30] studied skull shape variations in British Shorthair, Scottish Fold, and Van cats; Vishwakarma et al. [31] established cranial dimensions and sexual dimorphism in the skull bones of the gaur.

Despite the relevance of veterinary craniology, there is a limited number of standardized methods for evaluating skulls of various animal species, including horses-especially in the context of forensic veterinary examinations-since integrating traditional osteological methods with modern morphometric analysis provides a more objective and reproducible approach to identification.

Thus, the study of the skull of purebred Arabian horses in the context of forensic veterinary science holds both theoretical and practical interest, as it aims to develop a detailed methodological basis for craniometric analysis of purebred Arabian horses. By identifying consistent anatomical landmarks and evaluating morphological variations, this research seeks to assist forensic veterinary experts in accurately determining age and sex, thereby enhancing the evidential value of skeletal remains in legal proceedings.

This goal can be achieved through systematic scientific research, the creation of specialized methodological literature, and the development of appropriate computer technologies that would organize, simplify, and automate the processing of osteological research results based on a reference-testing principle.

In light of the above, studying age-related morphological characteristics of the skull – including that of purebred Arabian horses-while considering sex, for the purposes of forensic veterinary examination, based on rational methods of bone structure analysis, the comprehensive application of which in practice would allow for the objective determination of the animal's age, is of scientific and practical relevance.

The aim of the study

The aim of the work is to formulate and substantiate methodological approaches to the osteoscopic and osteometric study of the nasocranial part of the skull of purebred Arabian horses in the context of forensic veterinary examination.

Materials and methods

This study was conducted on a total of 36 dry skulls of purebred Arabian horses, collected from veterinary anatomical collections and verified through breeding records. The skulls were selected based on preservation quality, ensuring the absence of post-mortem damage, deformation, or pathological alterations that could interfere with morphometric analysis.

The osteometric and osteoscopic examination focused on the nasocranial region. Standard osteological landmarks were used to ensure consistency across measurements. Each skull was examined in a standardized position with the infraorbital foramen and facial crest properly aligned to provide reproducible reference planes.

Osteoscopic analysis involved visual inspection for sexually dimorphic traits, asymmetries, and specific breed-related morphological features such as the curvature of the nasal bones and the degree of frontal convexity. Observations were recorded using a structured checklist to ensure objectivity.

Age and sex of the specimens were determined based on available breeding documentation and confirmed by dental eruption and wear patterns where possible. Data were statistically analyzed using descriptive statistics and comparative analysis to assess the significance of metric and morphological differences between sexes and age groups.

All procedures adhered to ethical standards for the use of animal skeletal remains in research, and the study was conducted in accordance with institutional guidelines.

Results and discussion

The osteometric analysis of the nasocranial region in purebred Arabian horse skulls revealed distinct morphological patterns associated with sex and estimated age groups. The data were grouped into two primary

categories based on biological sex (male and female) and subdivided into age classes (young: 2–5 years, adult: 6–12 years, senior: >12 years).

1. Osteometric Measurements:

Significant differences were observed in several key cranial dimensions between male and female skulls. On average, males exhibited greater values in:

- Frontal width: Mean = 10.6 cm (males) vs. 9.8 cm (females);
- Nasal length: Mean = 15.2 cm (males) vs. 14.1 cm (females);
- Interorbital distance: Mean = 7.3 cm (males) vs. 6.7 cm (females);

Statistical analysis (t-test) confirmed that these differences were significant ($p < 0.05$), particularly in the frontal and nasal measurements. No significant difference was observed in maxillary length between sexes.

2. Osteoscopic Observations:

Visual inspection identified consistent sexual dimorphism in the curvature of the nasal bones and prominence of the supraorbital ridges. Male skulls typically exhibited:

- A broader and more convex frontal bone;
- More robust zygomatic arches;
- Deeper nasal depressions.

Female skulls were generally more gracile, with smoother contours and less pronounced cranial ridges.

3. Age-Related Variations:

Skulls from older horses (>12 years) showed more advanced suture closure, especially at the nasofrontal and interfrontal sutures. Additionally, dental wear patterns corresponded reliably with the age groups, supporting the osteological age estimation.

Overall, the combined use of quantitative and qualitative markers proved effective in distinguishing sex and estimating age from the nasocranial structures of Arabian horse skulls.

Table 1

Osteometric measurements on the dorso-lateral surface of the naso-maxillary region of the Arabian horse skull

Symbols	Measurement Point Name	Explanation
<i>Cranial Measurement Points</i>		
b	Bregma (frontal-parietal suture point)	Located at the junction of the metopic and frontal-parietal sutures in the median plane.
r	Rinion	Located at the anterior end of the nasal bone in the median plane.
n	Nasion	Located at the junction of the metopic and internasal sutures in the median plane.
nl	Lateral point of the nasal bone	Located at the nasomaxillary suture at the midpoint of the nasal bone length.
nm	Medial point of the nasal bone	Located at the internasal suture at the midpoint of the nasal bone length.
min	Incisor-maxillary suture point	Located at the oral end of the incisor-maxillary suture from the lateral surface.
tm	Maxillary tuberosity point	Located at the aboral edge of the maxillary tuberosity.
p	Prosthion	Located at the oral end of the interincisive suture.
r	Rinion	Located at the nasal end of the internasal suture.
tb	Cheek tuberosity point	Located at the apex of the cheek tuberosity.
fl	Frontal-lacrimal point	Located at the lateral end of the frontal-lacrimal suture at the dorsal edge of the ocular orbit.
ov	Orbital ventral point	Located at the intersection of the frontal process of the zygomatic bone and the ventral edge of the ocular orbit.
om	Orbital medial point	Located at the medial corner of the ocular orbit at the area of the lacrimal foramen.
ol	Orbital lateral point	Located at the lateral end of the suture between the zygomatic process of the frontal bone and the frontal process of the zygomatic bone.
<i>Cranial Parameters</i>		
1.	Length of the frontal bone	Distance between the bregma (b) and nasion (n) points.
2.	Length of the nasal bone	Distance between the rinion (r) and nasion (n) points.
3.	Direct width of the nasal bone	Distance between the lateral (nl) and medial (nm) points of the nasal bone.
4.	Incisor-maxillary suture length	Distance between the incisor-maxillary suture point (min) and the maxillary tuberosity point (tm).
5.	Cheek width of the skull	Distance between the left (tb) and right (tb I) cheek tuberosity points.
6.	Length of the nasal cavity entrance	Distance between the prosthion (p) and rinion (r) points.
7.	External orbital height	Distance between the frontal-lacrimal (fl) and orbital ventral (ov) points.
8.	External orbital width	Distance between the orbital medial (om) and orbital lateral (ol) points.

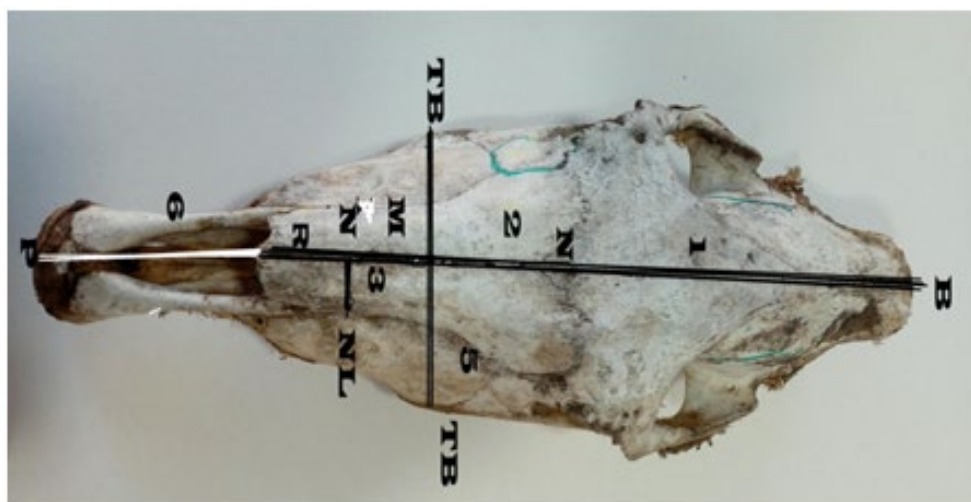


Fig. 1. Craniometric parameters. Dorso-lateral surface of the naso-cerebral region of the skull in the Arabian horse (explanation in the [table 1](#)). Macrophotograph: digital camera «Olympus C-5060 Wide Zoom». Source: developed by the authors of this study

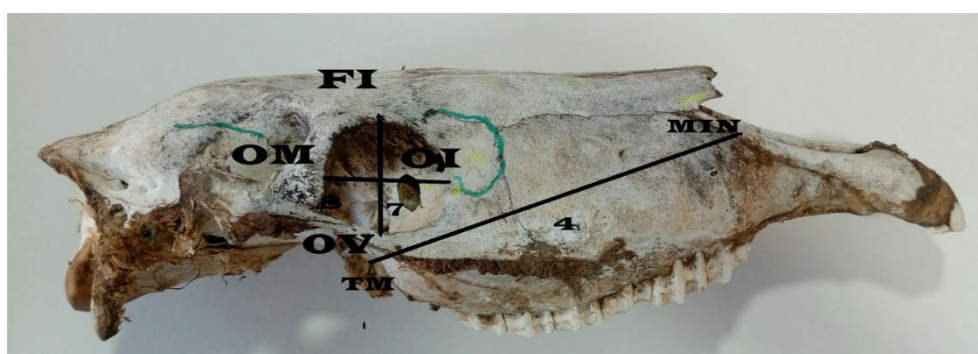


Fig. 2. Craniometric parameters. Lateral surface of the naso-cerebral region of the skull in the Arabian horse (explanation in [table 1](#)). Macrophotograph: digital camera "Olympus C-5060 Wide Zoom" Source: developed by the authors of this study

On the ventral surface of the naso-cerebral region of the skull of the Arabian horse, the following craniological features are identified: hypoglossal foramina, condylar canal, pharyngeal tubercles, oval foramen, choanae, bony palate, anterior (major) palatine

foramina, nasopalatine fissures, and incisive fissure.

On the ventral surface of the naso-cerebral region of the Arabian horse skull, we identified 8 osteometric points, based on which 8 craniometric parameters were developed ([Table 2](#), [Fig. 3](#)).

Table 2

Osteometric measurements on the ventral surface of the naso-cerebral region of the skull of the Arabian horse

Symbols	Measurement Point Name	Explanation
<i>Cranial Measurement Points</i>		
ba	Basion	Located at the lower margin of the foramen magnum in the median plane.
pr	Premolar Rostral Point	Located at the level of the rostral edge of P1 (first premolar) on the medial surface.
ci	Cylindro Point	Located at the apex of the ridge-like thickening of the palatal process of the incisive bone.
os	Occipital-Sphenoidal Point	Located at the junction between the rostral end of the occipital bone body and the aboral end of the sphenoid bone.
gp	Gamuli Pterygoidei Point	Located on the lateral surface of the hamular processes of the pterygoid bone.
st	Staphylin	Located at the aboral edge of the horizontal plate of the palatine bone, in the median plane.
ma	Molar Aboral Point	Located at the level of the aboral edge of M3 (third molar) on the medial surface.
po	Palatine Oral Point	Located on the most prominent part of the oral edge of the palatine bone, in the median plane.
<i>Cranial Parameters</i>		
9	Skull Length	Distance between basion (ba) and prosthion (p).
10	Edentulous Border Length	Distance between premolar rostral point (pr) and cylindro point (ci).
11	Occipital Bone Body Length	Distance between basion (ba) and occipital-sphenoidal point (os) along the median plane.
12	Choanal Length	Distance between occipital-sphenoidal point (os) and staphylin (st).
13	Choanal Width	Distance between left (gp) and right (gpl) gamuli pterygoidei points.
14	Aboral Width of the Hard Palate	Distance between left (ma) and right (ma) molar aboral points.
15	Rostral Width of the Hard Palate	Distance between left (pr) and right (prl) premolar rostral points.
16	Palatine Bone Length	Distance between staphylin (st) and palatine-oral point (po).

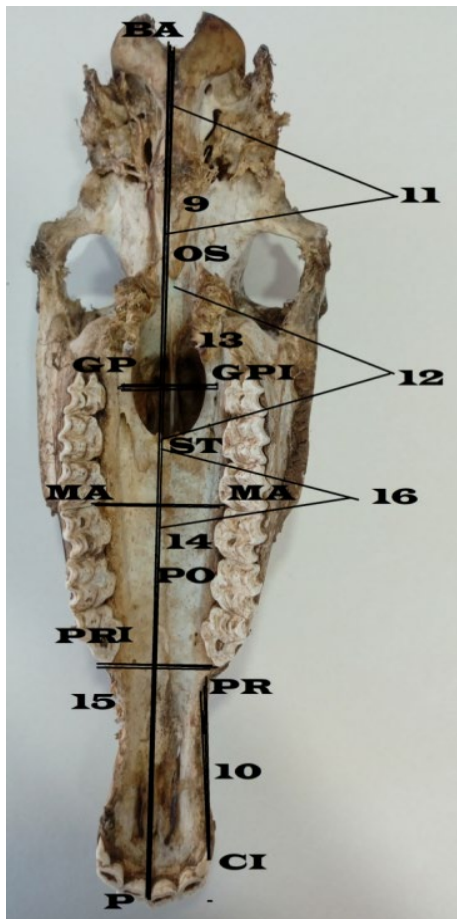


Fig. 3. Craniometric parameters. Ventral surface of the naso-cerebral region of the skull of the Arabian horse. Macrophotograph: digital camera "Olympus C-5060 Wide Zoom" (explanation in [table 2](#)). Source: developed by the authors of this study

The craniological parameters on the occipital surface of the naso-cerebral part of the skull in the Arabian horse include: the temporal crest, the shape of the interparietal bone, the foramen magnum, the occipital condyles, the

jugular processes, the nuchal fossa, and the occipital crests. On the occipital surface of the naso-cerebral part of the skull in the Arabian horse, we have identified 10 osteometric points, based on which 7 craniometric parameters were developed ([Table 3, Fig. 4](#)).

The result of the theoretical-experimental research conducted on the nasal-brain region of the skull generally includes the determination of qualitative craniological parameters and quantitative craniometric parameters (32 craniometric points, based on which 23 measurements were developed). The prospects for further research will involve determining the informativeness of both qualitative and quantitative craniometric parameters for craniological diagnosis of age and sex in Arabian horses.

Summarizing the results of the conducted research, it should be noted that the bones of an animal's skeleton are a valuable means of solving identification, diagnostic, and situational tasks that may arise in forensic veterinary examination. This discipline serves as a method of proving offenses committed against the life and health of animals, including cases of animal cruelty, poaching, and others, while the conclusion of a forensic expert constitutes a source of evidence in court.

Among the biological remains of an animal, its skull has high significance for determining species, sex, age, and past diseases, as it contains numerous informative morphological features.

The findings of this study demonstrate the forensic relevance of both osteometric and osteoscopic parameters in the nasocranial region of purebred Arabian horse skulls [5, 6, 7]. The significant sexual dimorphism observed in frontal width, nasal length, and interorbital distance suggests that these measurements can be reliably used to support biological profiling in forensic veterinary contexts, as confirmed by the scientific studies of Goodarzi et al. [19], Pompermayer et al. [20], and Alshami et al. [25]. These cranial traits not only reflect general sexual differences in equine skeletal morphology but also highlight breed-specific characteristics influenced by selective breeding practices in Arabian horses.

Table 3

Osteometric measurements on the occipital surface of the naso-cerebral part of the skull in the Arabian horse

Symbols	Measurement Point Name	Explanation
<i>Cranial Measurement Points</i>		
ba	Basion	Point located at the lower margin of the foramen magnum in the median plane.
b	Bregma	Junction of the interfrontal and frontotemporal sutures in the median plane.
fti	Frontotemporal Point	Point between the caudal end of the external frontal crest and the upper end of the temporal crest.
t	Temporal Point	Point between the caudal end of the zygomatic process of the temporal bone and the lower temporal crest.
op	Opisthion	Point at the upper margin of the foramen magnum in the median plane.
co	Condylar-Occipital Point	Junction of the lateral end of the upper margin of the foramen magnum and the occipital condyle.
cd	Superior Condylar Point	Highest point of the occipital condyle.
cv	Inferior Condylar Point	Lowest point of the occipital condyle.
cl	Lateral Condylar Point	Most protruding point at mid-length of the lateral edge of the occipital condyle.
cm	Medial Condylar Point	Most protruding point at mid-length of the medial edge of the occipital condyle.
<i>Craniometrical Parameters</i>		
17	Height of Occipital Surface	Distance between bregma (b) and basion (ba).
18	Dorsal Occipital Width	Distance between left (ft) and right (ftl) frontotemporal points.
19	Ventral Occipital Width	Distance between left (t) and right (tl) temporal points.
20	Vertical Diameter of Foramen Magnum	Distance between basion (ba) and opisthion (op).
21	Transverse Diameter of Foramen Magnum	Distance between left (co) and right (col) condylar-occipital points.
22	Length of Occipital Condyle	Distance between superior (cd) and inferior (cv) condylar points.
23	Width of Occipital Condyle	Distance between lateral (cl) and medial (cm) condylar points.

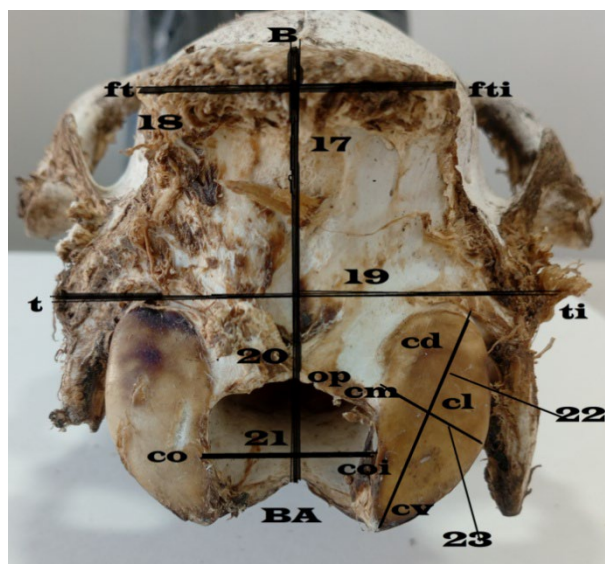


Fig. 4. Craniometric parameters. Occipital surface of the nasomental region of the skull. Macrophoto: Digital camera "Olympus C-5060" wide zoom (explanation in [table 3](#)).
Source: developed by the authors of this study

The osteoscopic assessment further complemented the quantitative analysis by identifying visually distinguishable features such as the degree of frontal convexity and the robustness of the zygomatic arches [18, 26]. These observations align with previous research in forensic anthropology and comparative veterinary osteology [18], reinforcing the utility of visual markers in cases where metric analysis may be limited due to fragmentary remains.

The study also revealed age-related changes in cranial suture closure and dental wear, consistent with established veterinary forensic methods for age estimation, as emphasized by Dickey et al. [32], Khazaeel et al. [33], Łuszczynski et al. [34], and Carmalt et al. [35]. The integration of age and sex identification into a unified methodological framework enhances the interpretive value of skeletal remains, particularly in legal investigations involving animal cruelty, neglect, or identity verification, as confirmed by Liu et al. [36], Trbojević et al. [37], and Rannamäe et al. [38].

Despite the robust findings, certain limitations must be acknowledged. The sample size, while representative, remains limited to purebred Arabian horses and may not fully reflect the cranial variation present across other breeds or mixed-breed populations, as highlighted by Sadeghi et al. [39]. Additionally, the use of dry skulls, though ideal for measurement accuracy, does not capture potential soft-tissue influences relevant to live-animal forensic assessments, as supported by the scientific research of Lund et al. [8].

Future research should expand the dataset to include a broader range of breeds and incorporate 3D imaging techniques to refine morphometric protocols, as noted by Kutara et al. [40] and Epperly et al. [41]. Establishing a comprehensive forensic database of equine cranial metrics could serve as a valuable reference for veterinary forensic practitioners worldwide.

Thus, the data of the above-mentioned researchers confirm the results of our study and demonstrate their

relevance, prospects, and practical significance in forensic veterinary examination and morphology.

Conclusions

This study establishes a systematic approach for the osteoscopic examination of the nasocranial region in purebred Arabian horse skulls, emphasizing its practical application in forensic veterinary science. The combined use of morphometric data and visual anatomical assessment enables accurate determination of sex and age, offering valuable tools for identifying unknown equine remains.

The identified cranial landmarks, particularly those associated with frontal and nasal bone morphology, exhibit consistent sexual dimorphism and age-related variation, supporting their forensic reliability. These findings contribute to the development of standardized protocols that enhance the scientific rigor of veterinary forensic investigations, particularly in legal contexts involving animal identification and post-mortem analysis.

By providing an evidence-based framework for cranial analysis, this research supports the growing role of veterinary forensic medicine in legal and ethical animal welfare assessments. Further studies are recommended to broaden the scope of application across other equine breeds and to integrate advanced imaging technologies for improved forensic accuracy.

Prospects for further research will be directed toward osteometric, radiographic, and X-ray densitometric studies of skulls of purebred Arabian horses in the context of forensic veterinary examination for the purpose of determining their age and sex.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The authors declare that the examination and osteometric analysis of the specimens were conducted in

accordance with international ethical norms and veterinary guidelines. Since this study was based exclusively on the evaluation of dry skulls of purebred Arabian horses (*Equus caballus*) obtained from veterinary anatomical collections and did not involve experiments on live animals, harm, or artificial induction of pathological states, formal institutional bioethics committee approval was not required.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The authors state that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

None.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The author declare that no artificial intelligence or AI-assisted technologies were used in the preparation of this manuscript.

References

1. Hanot, P., Bayarsaikhan, J., Guintard, C., Haruda, A., Mijiddorj, E., Schafberg, R., & Taylor, W. (2021). Cranial shape diversification in horses: variation and covariation patterns under the impact of artificial selection. *BMC Ecology and Evolution*, 21(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01907-5>
2. Fackler, N. P., Donahue, R. P., Bielajew, B. J., Amirhekmat, A., Hu, J. C., Athanasiou, K. A., & Wang, D. (2023). Characterization of the age-related differences in porcine acetabulum and femoral head articular cartilage. *Cartilage*, 16(3), 366–375. <https://doi.org/10.1177/19476035231214724>
3. Cáceres, J. O., & Sainz de los Terreros, J. Y. (2021). A real-world approach to identifying animal bones and Lower Pleistocene fossils by laser induced breakdown spectroscopy. *Talanta*, 235, 122780. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122780>
4. Schrock, K., Kerwin, S. C., & Jeffery, N. (2021). Outcomes and complications associated with acute gunshot fractures in cats and dogs. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 35(03), 205–212. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1739238>
5. Haut, R. C., & Wei, F. (2017). Biomechanical studies on patterns of cranial bone fracture using the immature porcine model. *Journal of Biomechanical Engineering*, 139(2), 021001. <https://doi.org/10.1115/1.4034430>
6. Macoveciuc, I., Márquez-Grant, N., Horsfall, I., & Zioupos, P. (2017). Sharp and blunt force trauma concealment by thermal alteration in homicides: An in-vitro experiment for methodology and protocol development in forensic anthropological analysis of burnt bones. *Forensic Science International*, 275, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.03.014>
7. Janeczek, M., Makowiecki, D., Rozwadowska, A., & Pasicka, E. (2023). Battle wound as a probable cause of the death of an early medieval horse in Ostrów Lednicki, Poland. *International Journal of Paleopathology*, 40, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2023.01.002>
8. Lund, J. R., Ketover, H. R., Hetzel, S., Waller, K., & Brounts, S. H. (2021). Computed tomographic assessment of brain tissue disruption and skull damage in equine cadaveric heads caused by various firearm-ammunition combinations applied as potential gunshot methods for euthanasia of horses. *American Journal of Veterinary Research*, 82(1), 28–38. <https://doi.org/10.2460/ajvr.82.1.28>
9. Ellingham, S., & A. Sandholzer, M. (2019). Determining volumetric shrinkage trends of burnt bone using micro-CT. *Journal of Forensic Sciences*, 65(1), 196–199. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14150>
10. Cartín-Rojas, A. (2017). Food fraud and adulteration: a challenge for the foresight of Veterinary Services. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 36(3), 1015–1024. <https://doi.org/10.20506/rst.36.3.2733>
11. Anagnostou, M., & Doberstein, B. (2021). Illegal wildlife trade and other organised crime: A scoping review. *Ambio*, 51(7), 1615–1631. <https://doi.org/10.1007/s13280-021-01675-y>
12. Corlatti, L., Sanz-Aguilar, A., Tavecchia, G., Gugiatti, A., & Pedrotti, L. (2019). Unravelling the sex- and age-specific impact of poaching mortality with multievent modeling. *Frontiers in Zoology*, 16(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0321-1>
13. Yatsenko, I., Tkachuk, S., Pasnichenko, O., Savchuk, L., & Derecha, L. (2022). Informativeness of the microscopic structures of the diaphysis of the metatarsal bones of female cattle for the forensic and veterinary determination of their age. *Scientific Progress & Innovations*, 4, 186–197. <https://doi.org/10.31210/visnyk2022.04.23>
14. Schmidt, M. J., Steenkamp, G., Failing, K., Caldwell, P., & Kirberger, R. M. (2019). A contribution to age determination of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) based on radiographic analysis of the skull and postcranial morphology. *Plos One*, 14(6), e0217999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217999>
15. Yu, K., Wu, H., Shen, C., Li, H., Wei, X., Liu, R., Cai, W., Wang, G., Sun, Q., & Wang, Z. (2021). Identification of antemortem and postmortem fractures in a complex environment by FTIR spectroscopy based on a rabbit tibial fracture self-control model. *International Journal of Legal Medicine*, 135(6), 2385–2394. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02633-9>
16. Havrylin, P. M., Prokushenkova, O. H., Yatsenko, I. V., Shuleshko, O. O., & Masyuk, D. M. (2012). Sudovo-veterynarnye vyznachennia vydu tvaryn za okremymy frahmentamy tyla [Forensic veterinary determination of animal species based on individual body fragments]. *Problemy Zoorhanizatsii ta Veterynarnoi Medytsyny*, 24(2), 426–430. (in Ukrainian)
17. Jaworski, K., Pankiewicz, A., Chrószcz, A., & Poradowski, D. (2020). Different approach to horses – the use of equid remains in the early Middle Ages, on the example of ostrów Tumski in Wrocław. *Animals*, 10(12), 2294. <https://doi.org/10.3390/ani10122294>
18. Abuznaid, K. R. S. (2015). Vyznachennia viku ta staty za kraniometrychnymi pokaznykamy velykoi rohatoi hudoby pry sudovo-veterynarnii ekspertyzii [Determination of age and sex based on craniometric indices of cattle in forensic veterinary examination]. *Problemy Zoonzhenerii ta Veterynarnoi Medytsyny: Zbirnyk Naukovykh Prats Kharkivskoi Derzhavnoi Zooveterynarnoi Akademii*, 31(2), 226–234. (in Ukrainian)
19. Goodarzi, N., Zehtabvar, O., & Tohidifar, M. (2021). Applied anatomy of the skull in the Arabian horse: A computed tomographic, cross-sectional, volumetric and morphometric study. *Veterinary Medicine and Science*, 7(6), 2225–2233. <https://doi.org/10.1002/vms3.618>
20. Pompermayer, E., Hoey, S., Ryan, J., David, F., & Johnson, J. P. (2023). Straight Egyptian Arabian skull morphology presents unique surgical challenges compared to the Thoroughbred: a computed tomography morphometric anatomical study. *American Journal of Veterinary Research*, 84(5), 1–7. <https://doi.org/10.2460/ajvr.22.11.0191>
21. Merkies, K., Paraschou, G., & McGreevy, P. D. (2020). Morphometric characteristics of the skull in horses and donkeys – A pilot study. *Animals*, 10(6), 1002. <https://doi.org/10.3390/ani10061002>
22. Parés-Casanova, P. M. (2021). No modularity at ventral level in the horse skull. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 50(5), 849–852. Portico. <https://doi.org/10.1111/ahc.12728>
23. Maško, M., Wierzbicka, M., Zdrojkowski, Ł., Jasiński, T., Sikorska, U., Pawliński, B., & Domino, M. (2022). Comparison of donkey, pony, and horse dorsal profiles and head shapes using geometric morphometrics. *Animals*, 12(7), 931. <https://doi.org/10.3390/ani12070931>
24. Liuti, T., & Dixon, P. M. (2020). The use of the geometric morphometric method to illustrate shape difference in the skulls of different-aged horses. *Veterinary Research Communications*, 44(3-4), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s11259-020-09779-8>
25. Alshami, A. M., Pompermayer, E., Troteaga Alvarez, C., Hoey, S., Ryan, J., & Johnson, J. P. (2023). Comparison of computed tomography assisted 3D cephalometric measurements in straight egyptian arabian and thoroughbred horses. *Journal of Veterinary Dentistry*, 41(1), 43–48. <https://doi.org/10.1177/08987564231203918>

26. Alhaddad, H., Powell, B. B., Pinto, L. D., Sutter, N., Brooks, S. A., & Alhajeri, B. H. (2024). Geometric morphometrics of face profile across horse breeds and within Arabian horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 132, 104980. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104980>
27. Jashari, T., Kahvecioğlu, O., Duro, S., & Gündemir, O. (2022). Morphometric analysis for the sex determination of the skull of the Deltari Ilir dog (*Canis lupus familiaris*) of Kosovo. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 51(4), 443–451. <https://doi.org/10.1111/ahc.12807>
28. Gündemir, O., Duro, S., Jashari, T., Kahvecioğlu, O., Demircioğlu, İ., & Mehmeti, H. (2020). A study on morphology and morphometric parameters on skull of the Bardhoka autochthonous sheep breed in Kosovo. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 49(3), 365–371. <https://doi.org/10.1111/ahc.12538>
29. Çakar, B., Tandir, F., Güzel, B. C., Bakıcı, C., Ünal, B., Duro, S., Szara, T., Spataru, C., Spataru, M.-C., & Gündemir, O. (2024). Comparison of skull morphometric characteristics of Simmental and Holstein cattle breeds. *Animals*, 14(14), 2085. <https://doi.org/10.3390/ani14142085>
30. Gündemir, O., Szara, T., Yalin, E. E., Karabagli, M., Mutlu, Z., Yilmaz, O., Büyükcinal, S. K., Blagojevic, M., & Parés-Casanova, P. M. (2023). Examination of shape variation of the skull in British Shorthair, Scottish Fold, and van cats. *Animals*, 13(4), 614. <https://doi.org/10.3390/ani13040614>
31. Vishwakarma, R., Sharma, C. P., Mondol, S., Habib, B., Bhandari, B., Mishra, R., Gupta, N., Chauhan, J. S., & Nigam, P. (2024). Preliminary study on cranial measurements and sexual dimorphism in skull bones of gaur (*Bos gaurus gaurus*, Smith 1827). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 53(3), e13031. <https://doi.org/10.1111/ahc.13031>
32. Dickey, J. P., Carmalt, J. L., & Reiswig, J. D. (2022). A retrospective observational cohort study on the expiration of maxillary cheek teeth infundibula in 217 horses. *Journal of Veterinary Dentistry*, 40(1), 12–18. <https://doi.org/10.1177/08987564221128116>
33. Khazaeel, K., Pesarakli, H., Mashhadi, A. G., & Borujeni, M. P. (2021). Age estimation of Arabian mares by incisors morphometry and dentition changes. *Veterinary Research Communications*, 46(2), 405–417. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09865-5>
34. Łuszczynski, J., Pieszka, M., Petrych, W., & Stefaniuk-Szmukier, M. (2019). The frequency of errors in determining age based on selected features of the incisors of Icelandic horses. *Animals*, 9(6), 298. <https://doi.org/10.3390/ani9060298>
35. Carmalt, J. L., Henderson, K. V., Rawlinson, J. E., & Waldner, C. L. (2018). Use of crown height of the maxillary first molar tooth to approximate the age of horses. *American Journal of Veterinary Research*, 79(8), 867–873. <https://doi.org/10.2460/ajvr.79.8.867>
36. Liu, X., Seguin-Orlando, A., Chauvey, L., Tressières, G., Schiavinato, S., Tonasso-Calvière, L., Aury, J.-M., Perdureau, A., Wagner, S., Clavel, P., Estrada, O., Pan, J., Ma, Y., Enk, J., Devault, A., Klunk, J., Lepetz, S., Clavel, B., Jiang, L., Wincker, P., Collin, Y. R. H., Sarkissian, C. D., & Orlando, L. (2023). DNA methylation-based profiling of horse archaeological remains for age-at-death and castration. *iScience*, 26(3), 106144. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106144>
37. Trbojević Vukičević, T., Korpes, K., Đuras, M., Vrbanac, Z., Javor, A., & Kolenc, M. (2023). Paleopathological changes in animal bones from Croatian archaeological sites from prehistory to new modern period. *Veterinary Sciences*, 10(5), 361. <https://doi.org/10.3390/vetsci10050361>
38. Rannamäe, E., Andrianov, V., Järv, E., Semjonov, A., Haak, A., & Kreem, J. (2019). A month in a horse's life: healing process of a fractured third metatarsal bone from medieval Viljandi, Estonia. *International Journal of Paleopathology*, 24, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2018.07.003>
39. Sadeghi, R., Moradi-Shahrabak, M., Miraei Ashtiani, S. R., Schlamp, F., Cosgrove, E. J., & Antczak, D. F. (2018). Genetic diversity of Persian Arabian horses and their relationship to other native Iranian horse breeds. *Journal of Heredity*, 110(2), 173–182. <https://doi.org/10.1093/jhered/esy061>
40. Kutara, K., Ono, T., Hisaeda, K., Inoue, Y., Henmi, C., Sho, K., Ohnishi, A., Ohzawa, E., Une, Y., Iwata, E., Shibano, K., Asanuma, T., & Kitagawa, H. (2022). An anatomical study of the skull, the dorsal and ventral nasal conchal bullae and paranasal sinuses in normal Noma horses: Computed tomographic anatomical and morphometric findings. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 51(5), 624–632. <https://doi.org/10.1111/ahc.12837>
41. Epperly, E., & Whitty, J. A. (2020). Equine imaging. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 36(3), 527–543. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2020.08.007>

ORCID

- | | |
|---|---|
| I. Yatsenko  | https://orcid.org/0000-0001-8903-2129 |
| R. S. K. Abuznaid  | https://orcid.org/0009-0007-0792-5275 |
| V. Binkevych  | https://orcid.org/0009-0001-6234-7814 |
| I. Biben  | https://orcid.org/0000-0002-5580-5135 |
| L. Savchuk  | https://orcid.org/0000-0002-6042-8362 |
| V. Dobrovolskyi  | https://orcid.org/0000-0002-2678-5649 |
| N. Kravchenko  | https://orcid.org/0000-0002-3868-3551 |



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Clinical and biochemical substantiation of Iruvetol cream-gel application in the treatment of accidental purulent wounds in horses

O. Latukhin✉

Article info

Correspondence Author
O. Latukhin
E-mail:
oleh.latukhin@pdau.edu

Poltava State Agrarian
University,
Skovoroda Str., 1/3,
Poltava, 36000, Ukraine

Citation: Latukhin, O. (2026). Clinical and biochemical substantiation of Iruvetol cream-gel application in the treatment of accidental purulent wounds in horses. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 78–85. doi: 10.31210/spi2026.29.02.12

The article presents a study on the prevalence of accidental surgical trauma in horses and provides a clinical, biochemical, and planimetric substantiation of Iruvetol ointment efficacy in purulent wound treatment. The research was conducted in 2025–2026 at Vladus Riding Club (Mykhailivka, Poltava region) on two groups of horses with accidental infected wounds. Wound injuries were diagnosed in 24.1 % of the examined population. Trauma demonstrated a clear seasonal dependence: in geldings and foals, injuries occurred exclusively in spring (100.0 %), while in mares, 66.7 % of wounds were recorded in spring and 33.3 % in summer. Planimetric measurements proved that local application of Iruvetol ointment provides a pronounced anti-edematous effect, reducing the marginal edema zone area by 11.4 % on the second day and by 32.5 % on the third day relative to the baseline level, which significantly exceeded the edema reduction rate in the control group (26.3 %, $p < 0.01$). Cleansing of the wound cavity from necrotic detritus in the experimental group was 13.3 % faster than in the control group. On the twenty-first day, the final wound area with Iruvetol was 2.8 times smaller than the baseline and 11.9 % smaller than in the control group. Biochemical serum analysis revealed that baseline activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase in sick animals exceeded the norm by 32.0 %, 38.4 %, and 22.8–50.4 %, respectively. On the fifth day, the experimental group showed a decrease in alanine aminotransferase activity by 27.0 %, aspartate aminotransferase by 10.9 %, and alkaline phosphatase by 17.3 %, whereas the control group demonstrated a 50.7 % increase in alanine aminotransferase, unchanged aspartate aminotransferase, and only an 8.2 % decrease in alkaline phosphatase ($p < 0.01$ between groups). At the end of the experiment (fifteenth day), aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase activity with Iruvetol was lower than in the control by 14.0 % and 54.9 %, confirming the diagnostic and prognostic value of evaluating the enzymatic profile. The practical value of the work lies in a methodological substantiation of Iruvetol ointment local application to ensure successful treatment of accidental purulent wounds in horses.

Keywords: horses, accidental purulent wounds, local therapy, Iruvetol ointment, planimetry, biochemical parameters, blood serum, enzyme activity.

Клініко-біохімічне обґрунтування застосування крем-гелю «Іруветол» у лікуванні випадкових гнійних ран у коней

О. Є. Латухін

Полтавський державний
аграрний університет,
м. Полтава, Україна

У статті наведено результати вивчення поширеності випадкового хірургічного травматизму у коней, а також клініко-біохімічне й планіметричне обґрунтування ефективності застосування крем-гелю «Іруветол» у лікуванні гнійних ран. Дослідження виконували в період 2025–2026 рр. на базі кінного клубу «Vladus riding club» (с. Михайлівка Полтавського району) на двох групах тварин. Установлено, що серед усього обстеженого поголів'я рани діагностовано у 24,1 % коней. Травматизм мав чітку сезонну залежність: у меринів та лоша́т у 100,0 % випадків поранення реєстрували навесні, тоді як серед кобил 66,7 % ушкоджень виявляли у весняний період, а 33,3 % – у літній. На підставі планіметричних вимірювань доведено, що локальне застосування крем-гелю «Іруветол» забезпечує виражений протинабряковий ефект, сприяючи зменшенню площі зони крайового набряку на другу добу на 11,4 %, а на третю добу – на 32,5 % відносно вихідного рівня, що статистично вірогідно ($p < 0,01$) та на 6,2 % швидше порівняно з контрольними показниками (26,3 %). Очищення ранової порожнини від некротичних тканин в дослідній групі відбувалося на 13,3 % швидше порівняно з використанням аерозолу «Чемі-спрей». На 21-шу добу досліді площа ран за дії крем-гелю «Іруветол» була у 2,8 рази меншою за вихідні дані та на 11,9 % меншою, ніж у контрольній групі. За результатами біохімічних досліджень виявлено, що вихідна активність аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та лужної фосфатази перевищувала норму на 32,0 %, 38,4 % та 22,8–50,4 % відповідно. На 5-ту добу лікування в дослідній групі зафіксовано зниження активності аланінамінотрансферази на 27,0 %, аспартатамінотрансферази – на 10,9 %, лужної фосфатази – на 17,3 %, тоді як у контрольній групі активність аланінамінотрансферази зросла на 50,7 %, аспартатамінотрансферази залишилися незмінною, а лужної фосфатази знизилася лише на 8,2 % ($p < 0,01$ між групами). Наприкінці досліді (15-та доба) активність аспартатамінотрансферази та лужної фосфатази у дослідній групі була нижчою, ніж у контрольній, відповідно на 14,0 % та 54,9 %, що підтверджує високу діагностичну та прогностичну цінність оцінювання ферментного профілю. Практична цінність роботи полягає в методологічному обґрунтуванні високої терапевтичної ефективності локального застосування крем-гелю «Іруветол» для забезпечення успішного лікування випадкових гнійних ран у коней.

Ключові слова: коні, випадкові гнійні рани, локальна терапія, крем-гель «Іруветол», планіметрія, біохімічні показники, сироватка крові, активність ферментів.



Бібліографічний опис для цитування: Латухін О. Є. Клініко-біохімічне обґрунтування застосування крем-гелю «Іруветол» у лікуванні випадкових гнійних ран у коней. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 78–85.

Вступ

Значною проблемою під час вирощування, експлуатації, спортивних змагань та тренінгу коней є травматизм. У структурі загальної хірургічної патології він становить 86 %, при цьому 51,5 % випадків припадає на рани, що ускладнюються розвитком гнійної інфекції [1].

У наукових працях детально досліджено особливості виникнення ран у нігерійських коней. За даними авторів, під час обстеження 207 тварин ушкодження виявлено у 21 особини (10,1 %). Дослідниками з'ясовано такий розподіл ран за локалізацією на тілі тварин: у ділянці тазових кінцівок та стегон – по 19,1 %, боків – 14,3 %, голови, передніх кінцівок, попереку та черева – по 9,5 %, хвоста та крупу – по 4,8 %. Установлено, що травматизм не мав суттєвої залежності від статі тварин чи сезону року. Водночас частота виникнення ран у дорослих коней була статистично значуще вищою ($p < 0,05$), ніж у молодих та старих особин [2].

У наукових джерелах зазначено, що мікробіота шкіри коней є багатим та стабільним середовищем, яке порушується внаслідок поранення, проте відновлюється до вихідного стану після повного загоєння. Дослідниками доведено, що анатомічне розташування суттєво впливає на бактеріальний склад шкіри тварин під час регенераційних процесів. Також з'ясовано, що значний вплив на мікробіоту шкіри коней у процесі загоєння ран має накладання перев'язки [3].

За даними авторів, локальна терапія ранових ушкоджень у коней застосовується для очищення та дезінфекції ранового середовища після гострої травми, а також для стимуляції загоєння та зниження ризику розвитку інфекції після первинного хірургічного оброблення. Науковці наголошують, що стрімке зростання антибіотикорезистентності потребує виваженого та раціонального застосування системних антимікробних препаратів, особливо під час терапії місцевих інфекцій. Для успішного лікування ранових поверхонь необхідним є використання місцевих антисептиків (для дезінфекції гострих ран) та локальних антимікробних засобів (для хронічних ран). Крім того, застосування багатьох сучасних топічних препаратів дозволяє оптимізувати ранове середовище, сприяючи швидкій та ефективній регенерації тканин [4].

У науковій літературі описано особливості перебігу посттравматичних ран дистального відділу кінцівок у коней. Дослідниками з'ясовано, що ушкодження такого типу зазвичай гояться тривалий час за вторинним натягом. За даними авторів, локальне застосування препарату Tri-Solfen (лідокану гідрохлорид, бупівакаїну гідрохлорид, адреналіну кислий тартрат та цетримід [LBAC]) забезпечує ефективну післяопераційну шкірну анальгезію та сприяє прискоренню регенерації тканин [5].

В інших наукових працях було оцінено ефективність рідкого алотрансплантата амніотичної рідини (ELAA) кінського походження, отриманого з амніотичної рідини та амніотичної мембрани, на тривалість загоєння експериментально викликаних ран дистальних відділів кінцівок у коней.

Установлено, що одноразове введення препарату коням шляхом підшкірної ін'єкції не прискорювало загоєння таких ушкоджень [6].

У науковій періодиці повідомляється про успішне клінічне застосування терапії личинками у чотирьох коней із травматичними ранами, спричиненими дрютяними огорожами, лікування яких здійснювали в умовах ветеринарних клінік та безпосередньо у польових умовах на півдні Бразилії. За даними авторів, усі ушкодження характеризувалися некрозом тканин, гнійним ексудатом та неприємним запахом, що вказувало на розвиток інфекційного процесу та уповільнену регенерацію. Під час лікування стерильні личинки *Lucilia cuprina* (на стадії L1) наносили безпосередньо на ранові поверхні на 48 годин. Дослідниками з'ясовано, що таке втручання забезпечило швидке покращення загального стану ран: спостерігалось суттєве зменшення об'єму некротичних тканин, експресії ексудату та інтенсивності запаху, а також стимулювання розвитку грануляційної тканини в 3 клінічних випадках. Повне закриття ран фіксували у терміни від 10 до 60 діб [7].

В інших наукових розвідках також наголошується, що дистальні рани кінцівок залишаються серйозною клінічною проблемою у ветеринарній практиці. Установлено, що високу ефективність у терапії таких ушкоджень демонструє метод безпосереднього введення мезенхімальних стовбурових клітин шляхом ін'єкції безпосередньо в краї рани [8].

У науковій літературі наводяться дані, що внутрішньовенна терапія мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами демонструє високу ефективність, проте супроводжується ризиками, характерними для системного внутрішньосудинного введення. Дослідниками доведено, що таке лікування сприяє зменшенню площі ранової поверхні та зниженню концентрації всіх вимірюваних цитокінів, за винятком трансформуючого фактора росту $\beta 3$ [9].

За даними авторів, що базуються на результатах лікування 42 тварин, застосування вакуумної терапії (терапії ран негативним тиском) суттєво стимулює регенераційні процеси у коней. Результати досліджень продемонстрували, що цей метод за умови тривалого застосування може бути успішно використаний у клінічній практиці для лікування різних типів ушкоджень кінцівок [10].

У наукових розвідках повідомляється, що для підвищення ефективності вакуумної терапії доцільно відмовитися від громіздких конструкцій, непридатних для застосування в клінічній кінній практиці. Замість них дослідниками запропоновано застосовувати розроблений легкий, портативний та одноразовий пристрій NPWT (PICO®) [11].

В іншій праці було охарактеризовано фактори росту, що містяться в алотрансплантаті амніотичної мембрани коней, та оцінено їхній вплив на регенерацію ран дистальних відділів кінцівок. Дослідниками доведено, що використання такої мембрани сприяло інтенсивнішому утворенню грануляційної тканини на початкових етапах спостереження, зокрема на 7-му добу [11].

За даними авторів, септичний синовіт у коней зазвичай розвивається внаслідок травматичних ран. Дистальні відділи кінцівок тварин мають мінімальний захист м'яких тканин, через що uszkodження в цих анатомічних ділянках значно частіше зачіпають суміжні синовіальні структури. Дослідники наголошують, що успішне лікування інфікованих синовіальних структур, уражених внаслідок травмування, вимагає раннього та точного діагностування патологічного стану, швидкого усунення болю та запалення, повної ерадикації мікроорганізмів, належного загоєння рани та своєчасного відновлення функцій кінцівки [12].

У наукових джерелах зазначається, що ранові uszkodження у коней можуть гоїтися за мінімального втручання, проте існує високий ризик виникнення ускладнень під час їх оброблення. Це уповільнює регенеративні процеси та призводить до хронізації патологічного процесу. За даними авторів, для запобігання таким явищам за наявності відповідних показань доцільно проводити первинне закриття ран; водночас на ризик розвитку ускладнень впливає значна кількість чинників. Зокрема, поширеними причинами уповільненої регенерації є інфекція та формування біоплівки. Серед інших чинників, що перешкоджають загоєнню, дослідниками виділено наявність сторонніх тіл, утворення кісткових секвестрів, розвиток надмірної грануляційної тканини, неопластичну трансформацію та габронеміоз [13].

У літературі також наголошується, що секрет мезенхімальних стромальних клітин виявляє виражені регенераторні, імуномодулювальні та антибактеріальні ефекти *in vivo*, зокрема за наявності ран, інфікованих антибіотикорезистентними штамами бактерій [14].

Згідно з висновками дослідників, процеси загоєння ран дистальних відділів кінцівок у коней мають суттєві відмінності порівняно з травмами тулуба, що зазвичай виявляються у розвитку гіпергрануляції, оголенні кісткової тканини та формуванні секвестрів [15].

В інших експериментальних працях було вивчено вплив інтерлейкіну-10 вірусу орф (orf) та фактора росту судинного ендотелію-Е на регенерацію тканин. Отримані результати засвідчили, що оброблення вірусним білком не пригнічує запальний процес у рані чи утворення грануляційної тканини, проте активно сприяє відновленню судин і епідермісу, а також інволюції грануляцій [16].

Мета дослідження

Мета роботи – дослідити особливості поширення, локалізації та клінічного перебігу випадкових гнійних ран у коней, а також клініко-біохімічно та планіметрично обґрунтувати ефективність локального застосування крем-гелю «Іруветол» у порівняльній схемі їх терапії.

Матеріали і методи

Дослідження виконували в умовах кінного клубу «Vladus riding club» (с. Михайлівка Полтавського району) в період 2025–2026 рр.

Об'єктом дослідження були коні з випадковими гнійними ранами, діагностованими на підставі комплексного клінічного огляду. Роботу проводили поетапно. На першому етапі визначали поширеність випадкових гнійних ран у коней, вивчали клінічну симптоматику та відпрацьовували методику обстеження поранених тварин.

Для вивчення терапевтичної ефективності локального застосування крем-гелю «Іруветол» було сформовано дві групи тварин (дослідну та контрольну) по 3 голови в кожній, у яких діагностували випадкові інфіковані рани.

- Тваринам дослідної групи (n=3) порожнину ран один раз на добу промивали 3 % розчином перексиду водню, після видалення залишків якого та авіталізованих тканин у ранову порожнину вводили крем-гель «Іруветол». Зазначені процедури виконували щодня до повного зникнення ознак гнійної ексудації.

- Тваринам контрольної групи (n=3) локально застосовували антибактеріальний препарат у формі аерозолу «Чемі-спрей».

Під час обстеження ран у коней визначали їхню форму, розміри, стан стінок, країв і дна, а також характер, колір і запах ранового ексудату, особливості розвитку грануляційної тканини та епітелізації. На 1-шу, 7-му та 10-ту добу лікування здійснювали планіметричні вимірювання. Зокрема, визначали площу зони крайового набряку та площу рани за методикою Л. Н. Попової, що полягала в перенесенні контурів uszkodження на целофанову плівку з подальшим підрахунком площі за допомогою міліметрового паперу.

Відсоток зменшення площі ранової поверхні (S) розраховували за формулою:

$$S = \frac{(S_p - S_n) \cdot 100}{S_p \cdot t},$$

де S_p – площа рани під час попереднього вимірювання, см²; S_n – площа рани в момент поточного дослідження, см²; t – кількість днів між першим та наступним вимірюванням.

Лабораторний етап передбачав вивчення біохімічного складу сироватки крові коней за такими показниками: активність аспартатамінотрансферази (АсАТ), аланінамінотрансферази (АлАТ) та лужної фосфатази (ЛФ), вміст загального кальцію, загального протеїну, а також рівень С-реактивного білка (СРБ). Дослідження виконували на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі ВА-88А виробництва компанії «Mindray» (КНР) тричі: на 1-шу, 5-ту та 15-ту добу експерименту.

Біометричний аналіз та статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою загальноприйнятих методів варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel. Розраховували середнє арифметичне значення (M) та стандартну помилку середнього (m). Вірогідність різниці між показниками оцінювали за критерієм Стюдента.

Результати та їх обговорення

Під час проведення клініко-хірургічного обстеження аналізували залежність частоти виникнення ран у коней від сезону року (*табл. 1*). Для цього було проведено ретельний огляд поголів'я кінного клубу загальною кількістю 29 тварин, яких за статеві-

віковими ознаками було розподілено на три окремі групи: мерини (5 голів), кобили (15 голів) та лошата (9 голів). Такий підхід дозволив не лише простежити загальну сезонну динаміку травматизму протягом календарного року, а й детально з'ясувати схильність до ушкоджень різних категорій тварин залежно від умов їхнього утримання та експлуатації.

Таблиця 1

Поширеність випадкових гнійних ран у коней залежно від статеві-вікових груп та сезонності

Статеві-вікові групи	Обстежено тварин, голів	Виявлено травмованих протягом року, гол. / %	Осінь, гол. / %	Зима, гол. / %	Весна, гол. / %	Літо, гол. / %
Мерини	5	3 / 60,0	0 / 0,0	0 / 0,0	3 / 100,0	0 / 0,0
Кобили	15	3 / 20,0	0 / 0,0	0 / 0,0	2 / 66,7	1 / 33,3
Лошата	9	1 / 11,1	0 / 0,0	0 / 0,0	1 / 100,0	0 / 0,0
Усього	29	7 / 24,1	0 / 0,0	0 / 0,0	6 / 85,7	1 / 14,3

Аналіз даних *таблиці 1* свідчить про те, що із загальної кількості обстежених протягом року тварин у 24,1 % випадків було діагностовано рани. Зокрема, у групі меринів травматизм виявлено у 60,0 % особин, кобил – у 20,0 %, а серед лошат – у 11,1 %. Оцінюючи сезонну динаміку виникнення ран, установлено, що травмування меринів у 100,0 % випадків відбувалося у весняний період. Серед кобил 66,7 % ушкоджень реєстрували навесні, а 33,3 % – у літній сезон. У групі лошат єдиний випадок травмування (100,0 %) також зафіксовано навесні.

Отже, отримані результати демонструють, що найвищий відсоток ураження в межах своєї групи реєстрували серед меринів (60,0 %), тоді як за абсолютною кількістю найчастіше травмувалися кобили та мерини (по 3 голови). При цьому в переважній більшості випадків травмування коней усіх статеві-вікових груп відбувалося саме у весняний період.

Відповідно до поставлених завдань, під час досліджень визначали анатомічні ділянки тіла тварин, які найбільше піддавалися травматизації (*табл. 2*), а також вивчали безпосередній характер виявлених ушкоджень (*табл. 3*).

Таблиця 2

Локалізація випадкових гнійних ран у коней залежно від статеві-вікових груп

Статеві-вікові групи	Кількість травмованих, голів	Кінцівки, гол. / %	Шия, гол. / %	Грудна стінка, гол. / %	Сечостатеві органи, гол. / %	Голова, гол. / %
Мерини	3	2 / 66,7	0 / 0,0	1 / 33,3	0 / 0,0	0 / 0,0
Кобили	3	2 / 66,7	0 / 0,0	1 / 33,3	0 / 0,0	0 / 0,0
Лошата	1	0 / 0,0	1 / 100,0	0 / 0,0	0 / 0,0	0 / 0,0
Усього	7	4 / 57,1	1 / 14,3	1 / 14,3	0 / 0,0	0 / 0,0

Аналіз отриманих результатів, представлених у *таблиці 2*, переконливо засвідчив, що найчастіше у коней травмується ділянка кінцівок, на яку припадає 57,1 % від усіх випадків поранень. Рідше реєстрували

ушкодження в ділянці шиї та грудної стінки – відповідно по 14,3 % для кожної анатомічної зони. При цьому травм сечостатевих органів і голови у дослідних тварин не виявлено.

Таблиця 3

Характеристика випадкових гнійних ран у коней за видом ушкодження

Статеві-вікові групи	Кількість травмованих, голів	Кусано-рвані, гол. / %	Різані, гол. / %	Колоті, гол. / %
Мерини	3	1 / 33,3	2 / 66,7	0 / 0,0
Кобили	3	0 / 0,0	2 / 66,7	1 / 33,3
Лошата	1	0 / 0,0	0 / 0,0	1 / 100,0
Усього	7	1 / 14,3	4 / 57,1	2 / 28,6

Оцінюючи характер механічних пошкоджень (*табл. 3*), установлено превалювання різаних ран, які діагностували у 57,1 % випадків (найчастіше у меринів та кобил – по 2 голови в кожній групі). Колоті рани посідають друге місце у структурі травматизму (28,6 %) та фіксувалися у кобил і лошат. Найменшу питому вагу мали кусано-рвані рани (14,3 %), зареєстровані лише в одного мерина. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що найбільш

уразливими анатомічними ділянками тіла коней є кінцівки, а основним видом механічних пошкоджень – різані рани.

Вивчаючи причини появи випадкових гнійних ран у коней, установлено, що у 100,0% випадків вони були обумовлені контактом із травмувальними предметами. Клінічні ознаки, виявлені у поранених тварин на момент первинного огляду, представлені в *таблиці 4*.

Таблиця 4

Основні вихідні клінічні ознаки випадкових гнійних ран у дослідних коней

Кличка, вік, масть хворої тварини	Діагноз та локальні клінічні ознаки
1. Рижуха, 12 років, руда	Гнійна ексудація з рани, помірна кількість некротичних тканин, ерозивна кровотеча.
2. Денді, 5 років, сіра	Виразена болючість, запальний набряк, зяяння рани не виражене.
3. Карні, 7 років, руда	Різана рана з вираженим зяянням, кровотеча під час обстеження ушкодження, незначна кількість некротичних тканин.
4. Версаль, 12 років, ворона	Наявність кірочок запального ексудату на поверхні, помірне виділення гнійного ексудату під час пальпації (натискання).
5. Дефтез, 14 років, ворона	Незначні гнійні виділення з ранової порожнини, слабо виражена кровотеча.
6. Баз, 8 років, масть не вказана	Колота рана, зяяння не виражене, спостерігається сильна кровотеча.
7. Лоша, без клички	Колота рана без ознак кровотечі, рановий отвір склеєний підсохлим гнійним ексудатом.

Оцінюючи вихідну локальну клінічну картину, встановлено, що на момент постановки досліду симптоми ушкоджень у тварин суттєво не відрізнялися. Рани були заповнені некротичним детритом, згустками крові, також відмічали помірно виражену гнійну ексудацію.

Під час проведення первинної хірургічної обробки (ПХО), яка передбачала (за потреби) розсікання рани, здійснювали максимальне видалення некротизованих тканин механічним та інструментальним способами за допомогою скальпеля. Після санації стінки та дно ран залишалися набряклими внаслідок інтенсивного запального процесу, мали яскраво-червоне забарвлення; спостерігалася незначна капілярна кровотеча. По периферії ушкоджених ділянок виявляли зону крайового набряку тканин із нечітко окресленими контурами. Через ексцизію нежиттєздатних тканин площа ран після проведення ПХО незначно збільшувалася.

Динаміку регенераційних процесів і терміни відновлення тканин під впливом різних схем терапії відображено в *таблиці 5*.

Таблиця 5

Терміни очищення та загоєння випадкових гнійних ран у коней за різних схем лікування, діб ($M \pm m$, $n=3$)

Схема лікування (група)	Термін повного очищення ран, діб	Термін повного загоєння ран (епітелізації), діб
Дослідна («Іруветол»)	7,5 $\pm$ 0,6	25,6 $\pm$ 0,6
Контрольна («Чемі-спрей»)	8,5 $\pm$ 0,8	26,4 $\pm$ 0,7

За результатами спостережень встановлено, що звільнення ран від некротичного детриту та перехід запального процесу в репаративну фазу в дослідній групі відбувалися на 13,3 % швидше порівняно з аналогічним показником у тварин контрольної групи. Щодо такого показника, як закриття ранового дефекту з формуванням рубця, то ефективність локального застосування крем-гелю «Іруветол» на 3,0 % перевершувала результати використання «Чемі-спрею».

Отримані клінічні дані узгоджуються з результатами досліджень інших науковців. Зокрема, у наукових працях зазначено, що розвиток хірургічної патології у коней супроводжується у 87,5 % тварин перебігом хронічної запальної реакції,

а у 12,0 % – гострої [17]. Крім того, в аналогічних розвідках щодо лікування як післяопераційних (кастраційних), так і випадкових ран у коней наголошується, що під час їх терапії доцільно проводити адекватне знеболювання, антисептичну обробку з належним видаленням некротизованих тканин чи сторонніх предметів та подальшим закриттям рани швами. У разі загоєння ушкоджень за вторинним натягом дослідники рекомендують суворо враховувати стадійність ранового процесу з диференційованим вибором відповідних лікарських засобів [18].

Динаміка площі зони крайового набряку тканин під час лікування коней з інфікованими ранами мала помітні відмінності залежно від застосованої схеми терапії (*табл. 6*).

Таблиця 6

Динаміка площі зони крайового набряку при лікуванні коней з інфікованими ранами, см² ($M \pm m$, $n=3$)

Терміни спостереження, доба	Дослідна група («Іруветол»)	Контрольна група («Чемі-спрей»)
Вихідні дані (при виявленні)	28,0 $\pm$ 0,3	28,5 $\pm$ 0,4
2-га доба лікування	24,8 $\pm$ 0,6	25,5 $\pm$ 0,5
3-тя доба лікування	18,9 $\pm$ 0,1**	21,0 $\pm$ 0,4
5-та доба лікування	18,5 $\pm$ 0,6	19,4 $\pm$ 0,5
7-ма доба лікування	12,4 $\pm$ 0,3	13,5 $\pm$ 0,6
9-та доба лікування	9,0 $\pm$ 0,48	10,0 $\pm$ 0,8

Примітка: ** – $p < 0,01$ – порівняно з контрольною групою на відповідному етапі досліджень.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що на 2-гу добу лікування за використання крем-гелю «Іруветол» реєстрували зменшення площі зони крайового набряку на 11,4 % відносно вихідного рівня, тоді як в контрольній групі цей показник знизився на 10,5 % (активність регенерації в дослідній групі була вищою на 0,9 %).

На 3-тю добу спостереження в тварин дослідної групи зона набряку зменшилася на 32,5 % відносно первинних даних, що на 6,2 % перевищувало темпи редукції набряку за дії «Чемі-спрею» (26,3 %). У цей період встановлено високу статистичну вірогідність відмінностей між групами ($p < 0,01$).

На 5-ту добу відносно вихідного стану зменшення площі набряку за застосування крем-гелю «Іруветол» становило 33,9 %, що на 2,0 % випереджало показники контролю. На 7-му добу лікування

в дослідній групі зафіксовано зменшення зони крайового набряку більше ніж удвічі (на 55,7 %), що на 3,1 % краще порівняно з тваринами контрольної групи (52,6 %).

На 9-ту добу досліду реєстрували виражену позитивну динаміку в обох групах. Проте у тварин, які отримували крем-гель «Іруветол», площа набряку зменшилася у 3,1 раза (на 67,9 % від вихідного рівня), забезпечуючи випередження контрольних показників на 3,0 %.

Площа ранової поверхні у дослідних тварин у процесі лікування істотно зменшилася (*табл. 7*).

Таблиця 7

Динаміка площі ранової поверхні при лікуванні коней з інфікованими ранами, см² (M±m, n=3)

Терміни спостереження, доба	Дослідна група («Іруветол»)	Контрольна група («Чемі-спрей»)
1-ша доба лікування (вихідні дані)	10,2±0,3	10,4±0,3
3-тя доба лікування	9,2±0,8	9,9±0,6
7-ма доба лікування	7,4±0,3	8,4±0,3
21-ша доба лікування	3,7±0,2	4,2±0,2

Таблиця 8

Динаміка біохімічних показників сироватки крові коней у процесі лікування (M±m, n=3)

Біохімічні показники	Група тварин	1-ша доба досліду (вихідні дані)	5-та доба досліду	15-та доба досліду (кінець досліду)
АлАТ, Од/л	Контрольна	22,3±8,4	33,6±13,8	20,0±6,3
	Дослідна	22,2±2,1	16,2±1,9	17,4±1,5
АсАТ, Од/л	Контрольна	282,0±45,0	267,0±32,0	322,0±70,0
	Дослідна	276,0±40,0	246,0±29,0	277,0±30,0
ЛФ, Од/л	Контрольна	376,0±34,0	345,0±21,0	412,0±62,0
	Дослідна	307,0±35,0	254,0±14,0**	266,0±33,0*
Холестерол, ммоль/л	Контрольна	2,53±0,21	2,50±0,35	2,52±0,21
	Дослідна	1,95±0,18*	1,97±0,21	1,82±0,10**
Загальний протеїн, г/л	Контрольна	61,6±2,9	71,3±3,8	68,3±7,1
	Дослідна	63,2±3,6	64,2±5,5	66,2±3,6
Загальний кальцій, ммоль/л	Контрольна	2,83±0,30	2,94±0,20	2,70±0,40
	Дослідна	2,06±0,30*	2,80±0,01	2,60±0,10

Примітки: * – p<0,05, ** – p<0,01 – порівняно з контрольною групою на відповідному етапі досліджень.

Дослідженнями встановлено, що на початку експерименту у хворих тварин обох груп показники активності аланінамінотрансферази були на 32,0 % вищими за фізіологічну норму. У процесі лікування на 5-ту добу в контрольній групі активність АлАТ зросла на 50,7 % відносно вихідного рівня. Водночас у тварин дослідної групи, де застосовували крем-гель «Іруветол», активність ферменту, навпаки, знизилася на 27,0 %.

Порівняльний аналіз між групами засвідчив, що показники активності АлАТ у контрольній групі на 5-ту добу були удвічі вищими, ніж у дослідній. На 15-ту добу (кінець досліду) активність ензиму в контрольній групі знизилася на 40,5 % відносно 5-ї доби, повернувшись до вихідних значень. У дослідній групі на 15-ту добу відмічали незначне коливання активності ферменту (підвищення на 7,4 % порівняно з 5-ю добою), проте відносно початкового рівня цей показник залишався нижчим на 21,6 %. Наприкінці спостереження активність АлАТ у контрольній групі була на 14,9 % вищою порівняно з дослідною, при цьому в обох групах значення

Аналіз отриманих цифрових даних свідчить, що вже на 3-тю добу лікування за застосування крем-гелю «Іруветол» площа ранової поверхні зменшилася відносно вихідного рівня на 9,8 %, при цьому середній розмір дефекту був на 7,1 % меншим, ніж у контрольній групі.

На 7-му добу спостереження в дослідній групі показники знизилися на 27,5 % порівняно з вихідними даними (та на 19,6 % відносно рівня 3-ї доби), випереджаючи параметри тварин контрольної групи на 11,9 % (площа ран у контролі була на 13,5 % більшою порівняно з дослідом).

Кінцеві показники (на 21-шу добу) за застосування крем-гелю «Іруветол» були у 2,8 раза меншими порівняно з вихідними даними, а площа ранової поверхні виявилася на 11,9 % меншою, ніж у тварин контрольної групи (показник контрольної групи перевищував дослідний на 13,5 %).

Аналіз результатів біохімічних досліджень сироватки крові (*табл. 8*) дозволив оцінити метаболічний профіль організму коней та характер системної відповіді на розвиток гнійно-запального процесу й застосовану локальну терапію.

трансамінази дещо перевищували верхню межу референтних норм.

Подібну тенденцію реєстрували і щодо динаміки аспартатамінотрансферази, вихідна активність якої на початку досліду на 38,4 % перевищувала норму. На 5-ту добу лікування показники контрольної групи залишилися практично незмінними (зниження лише на 5,3 %), тоді як у дослідній групі активність ферменту зменшилася на 10,9 % відносно вихідного стану та була на 7,9 % меншою порівняно з контрольною групою. На 15-ту добу в контрольній групі спостерігалось вторинне зростання активності АсАТ на 20,6 % відносно 5-ї доби (та на 14,2 % відносно вихідних даних). У дослідній групі активність ензиму наприкінці досліду збільшилася на 12,6 % порівняно з 5-ю добою, практично наблизившись до початкових значень. Слід наголосити, що на 15-ту добу активність АсАТ у дослідній групі виявилася на 14,0 % нижчою, ніж у контрольній.

Вихідна активність лужної фосфатази в сироватці крові коней контрольної групи перевищувала норму на 50,4 %, а в дослідній – на 22,8 %. На 5-ту добу

показники обох груп знижувалися відносно початкового рівня: у контрольній групі – на 8,2 %, а в дослідній – на 17,3 %. При цьому активність ЛФ у тварин дослідної групи була вірогідно ($p < 0,01$) нижчою на 26,4 % порівняно з контролем. На 15-ту добу досліді в контрольній групі зареєстровано повторне інтенсивне зростання активності лужної фосфатази – на 19,4 % відносно 5-ї доби та на 9,6 % порівняно з вихідним рівнем. У дослідній групі показник стабілізувався і суттєво не змінювався порівняно з 5-ю добою. Наприкінці досліді (15-та доба) активність ЛФ у контрольній групі була статистично значущою ($< 0,05$) вищою на 54,9 % порівняно з аналогічним параметром тварин дослідної групи.

Під час аналізу динаміки концентрації холестеролу, загального кальцію та загального протеїну встановлено, що їхні фізіологічні коливання в процесі лікування тварин обох груп відбувалися переважно в межах референтних нормативних показників.

У науковій літературі наводяться дані про те, що під час фізичного навантаження в організмі коней активізуються процеси біосинтезу білків. Клінічним проявом цього є зростання в сироватці крові вмісту загального білка, сечової кислоти, загального кальцію, а також підвищення активності амінотрансфераз (АлАТ та АсАТ) [19].

Водночас у результатах інших аналогічних досліджень, що базуються на оцінюванні біохімічного профілю сироватки крові тварин, наголошується, що підвищення активності трансаміназ насамперед зумовлено розвитком деструктивних змін у гепатоцитах [20].

Висновки

Установлено, що серед обстеженого в період 2025–2026 рр. поголів'я коней у 24,1 % особин було діагностовано випадкові рани, які у структурі механічного травматизму найчастіше локалізувалися в ділянці кінцівок (57,1 %), а за характером ушкоджень переважали різані рани (57,1 %). Доведено, що локальне застосування крем-гелю «Ірувектол» у комплексному лікуванні тварин забезпечує високу терапевтичну ефективність, сприяючи на 13,3 % швидшому очищенню ранового дефекту від некротизованих тканин та скороченню термінів повного загоєння й епітелізації тканин до $25,6 \pm 0,6$ доби порівняно з використанням аерозолі «Чемі-спрей» ($26,4 \pm 0,7$ доби). Зазначена клінічна ефективність препарату підтверджується вираженням локальним протинабряковим ефектом з високою статистичною вірогідністю відмінностей між групами на 3-тю добу лікування ($p < 0,01$), а також більш інтенсивною стабілізацією метаболічного профілю організму тварин, що виявляється у суттєвому зниженні на 5-ту добу терапії активності сироваткових ферментів лужної фосфатази ($p < 0,01$) та аланінамінотрансферази, показники якої в контрольній групі у цей період були 2,1 раза вищими, ніж у дослідній.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Автор заявляє, що усі проведені клінічні дослідження та маніпуляції повністю відповідають нормам гуманного ставлення до тварин і принципам біоетики. Роботу виконано з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV) та Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту та Ради. З метою реалізації принципів гуманності (зокрема концепції «3R») у дослідженні було задіяно мінімально необхідну кількість тварин. Усі маніпуляції здійснювали виключно після отримання письмової інформованої згоди від власника кінного клубу, на базі якого виконували експериментальну частину роботи. Під час досліді тваринам забезпечували належні умови утримання, якісний догляд та мінімізацію стресових чинників за допомогою раціонального поводження й адекватного терапевтичного супроводу.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автор стверджує про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання ІІІ та технологій на основі ІІІ

Автор заявляє, що не використовував штучний інтелект або технології на основі ІІІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. Kulynich, S.M. (2015). The treatment of random purulent wounds of horses on the basis of chutovo stud farm «Westphalian». *Scientific Progress & Innovations*, 1-2, 99–101. <https://doi.org/10.31210/visnyk2015.1-2.20>
2. Agina, O. A., & Ihedioha, J. I. (2017). Occurrence of wounds in Nigerian horses. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 20(4), 372–380. <https://doi.org/10.1080/10888705.2017.1343149>
3. Kamus, L. J., Theoret, C., & Costa, M. C. (2018). Use of next generation sequencing to investigate the microbiota of experimentally induced wounds and the effect of bandaging in horses. *Plos One*, 13(11), e0206989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206989>
4. Leise, B. S. (2018). Topical wound medications. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 34(3), 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.eveq.2018.07.006>
5. Pratt, S., Sole-Guitart, A., de Klerk, K., Evans, E., Hume, J., Palmieri, C., Rainger, J., & Goodwin, W. (2024). Antinociceptive and wound healing effects of a commercial formulation of lidocaine, bupivacaine, adrenaline and cetrimide applied topically to superficial skin wounds in horses. *Veterinary Record*, 195(3), e4395. <https://doi.org/10.1002/vetr.4395>
6. Duddy, H. R., Schoonover, M. J., Williams, M. R., & Rudra, P. (2022). Healing time of experimentally induced distal limb wounds in horses is not reduced by local injection of equine-origin liquid amnion allograft. *American Journal of Veterinary Research*, 83(8), ajvr.21.10.0169. <https://doi.org/10.2460/ajvr.21.10.0169>

7. Dos Santos, T. S., Dillmann, J. B., Giovelli, M., Elias, G. O., Lima, R. K., Cescon, S., Stainki, D. R., Dos Santos, R. C., Corrêa, C., & Monteiro, S. G. (2026). Maggot therapy in horses with traumatic wounds caused by wire fences: Case reports. *Journal of Equine Veterinary Science*, 158, 105802. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2026.105802>
8. Textor, J. A., Clark, K. C., Walker, N. J., Aristizobal, F. A., Kol, A., LeJeune, S. S., Bledsoe, A., Davidyan, A., Gray, S. N., Bohannon-Worsley, L. K., Woolard, K. D., & Borjesson, D. L. (2018). Allogeneic stem cells alter gene expression and improve healing of distal limb wounds in horses. *Stem Cells Translational Medicine*, 7(1), 98–108. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0071>
9. Mund, S. J. K., MacPhee, D. J., Campbell, J., Honaramooz, A., Wobeser, B., & Barber, S. M. (2021). Macroscopic, histologic, and immunomodulatory response of limb wounds following intravenous allogeneic cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cell therapy in horses. *Cells*, 10(11), 2972. <https://doi.org/10.3390/cells10112972>
10. Launois, T., Moor, P. L., Berthier, A., Merlin, N., Rieu, F., Schlotterer, C., Siegel, A., Fruit, G., Dugdale, A., & Vandeweerdt, J. M. (2021). Use of negative pressure wound therapy in the treatment of limb wounds: A case series of 42 horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 106, 103725. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103725>
11. Fowler, A. W., Gilbertie, J. M., Watson, V. E., Prange, T., Osborne, J. A., & Schnabel, L. V. (2019). Effects of acellular equine amniotic allografts on the healing of experimentally induced full-thickness distal limb wounds in horses. *Veterinary Surgery*, 48(8), 1416–1428. <https://doi.org/10.1111/vsu.13304>
12. Ludwig, E. K., & van Harreveld, P. D. (2018). Equine wounds over synovial structures. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 34(3), 575–590. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2018.07.002>
13. Morales Yñiguez, F. J., & Leise, B. S. (2025). Complications in wound management. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 41(3), 563–578. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2025.08.006>
14. Rajesh, A., Ju, E. D. E., Oxford, K. A., Harman, R. M., & Van de Walle, G. R. (2024). The mesenchymal stromal cell secretome promotes tissue regeneration and increases macrophage infiltration in acute and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds in vivo. *Cytotherapy*, 26(11), 1400–1410. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.06.007>
15. Eggleston, R. B. (2018). Wound management: Wounds with special challenges. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 34(3), 511–538. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2018.07.003>
16. Wise, L. M., Bodaan, C. J., Stuart, G. S., Real, N. C., Lateef, Z., Mercer, A. A., Riley, C. B., & Theoret, C. L. (2018). Treatment of limb wounds of horses with orf virus IL-10 and VEGF-E accelerates resolution of exuberant granulation tissue, but does not prevent its development. *PLoS ONE*, 13(5), e0197223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197223>
17. Kulnych, S. M., Petrenko, M. O., & Bielakova, M. A. (2018). Analiz khirurhichnoi patolohii v umovakh kinnoho zavodu "Euro Equine Saint Nicholas des Bois France" [Analysis of surgical pathology in the conditions of the horse farm "Euro Equine Saint Nicholas des Bois France"]. In *Materialy II Vseukrainskoi naukovo-praktychnoi internet-konferentsii, prysviachenoj 60-richchiu z dnia narodzhennia profesora P. I. Lokesia*. (pp. 18–20). Poltava. (in Ukrainian)
18. Bohdanov, V. O., & Yemelianenko, O. V. (2025). Poshyrennia, diahnostyka ta likuvannia ran u konej [Spread, diagnostics and treatment of wounds in horses]. In *Vseukrainska naukova-praktychna konferentsiia zdobuvachiv vyshchoi osvity "Molod – dlia ahrarnoi nauky i vyrobnytstva". Aktualni problemy veterynarnoi medytyny* (pp. 175–177). Bila Tserkva. (in Ukrainian)
19. Zhegunov, G. F., Bayeva, T. I., & Vasilina, E. G. (2016). Metabolichniy profil syrovatky krovi sportyvnykh konej ukrainskoi verkhovoi porody v umovakh fizychnoho ta emotsiynoho navantazhennia [Metabolic profile of blood serum of Ukrainian sport horses under conditions of physical and emotional stress]. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series: Biology*, 27, 125–130. (in Ukrainian)
20. Prus, M. P., Shtrykul, N. S., Kurman, A. F., & Mokriy, Yu. O. (2010). Analiz biokhimichnykh pokaznykiv syrovatky krovi konej za babeziozu [Analysis of biochemical indicators of horse blood serum for babesiosis]. *Visnyk Poltavskoi Derzhavnoi Ahrarnoi Akademii*, 2, 101–103. (in Ukrainian).

ORCID

O. Latukhin 

<https://orcid.org/0009-0007-0171-0396>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Clove (*Syzygium aromaticum*) extract as a natural bio-preservative in milk: antimicrobial and organoleptic evaluationW. M. Mohamed¹ | I. E. Ibrahim² | A. A. Mohammed¹**Article info**

Correspondence Author

W. M. Mohamed

E-mail:

walla.m@uodiyala.edu.iq¹ College of Veterinary Medicine, University of Diyala, Al-Muradia, Old Baghdad-Baqubah Road, Baqubah, 32001, Diyala, Iraq² College of Veterinary Medicine, University of Kufa, Qazwiniya, Albuhadari Street, Kufa, 54003, Najaf, Iraq**Citation:** Mohamed, W. M., Ibrahim, I. E., & Mohammed, A. A. (2026). Clove (*Syzygium aromaticum*) extract as a natural bio-preservative in milk: Antimicrobial and organoleptic evaluation. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 86–94. doi: 10.31210/spi2026.29.02.13

The food industry increasingly struggles to achieve product biological safety while avoiding artificial chemical preservatives that raise significant health concerns among consumers. The purpose of this study was to determine the optimal concentration threshold of ethanolic clove (*Syzygium aromaticum*) extract that maximizes bacterial control in refrigerated bovine milk while successfully preserving its baseline organoleptic attributes. To achieve this, serial dilutions of ethanolic and aqueous extracts were evaluated via the agar well diffusion method against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and inoculated milk samples stored at 4±1°C were monitored for Total Aerobic Count alongside descriptive sensory analysis using a nine-point hedonic scale. The experimental results demonstrated that the untreated control group exhibited the highest microbial load, reaching 6.29 and 7.17 log CFU/mL on Day 1 and Day 2 of storage, respectively. Conversely, the incorporation of clove extracts resulted in a significant, concentration-dependent reduction in bacterial profiles ($p < 0.05$). Milk formulated with the maximum 100 % extract concentration demonstrated the highest antimicrobial efficacy, maintaining the lowest Total Aerobic Count values at 3.65 and 4.36 log CFU/mL. The agar well diffusion assay further verified that the ethanolic extract possessed a significantly more potent antibacterial activity compared to the aqueous variant, yielding superior zones of inhibition of 22 mm against *Staphylococcus aureus* and 21 mm against *Escherichia coli*, whereas the aqueous variant produced moderate zones of 20 mm. Notably, at the lowest 25 % concentration, neither extract displayed any detectable inhibitory activity. In the sensory evaluation, the inclusion of the ethanolic extract at 25 %, 50 %, and 75 % concentrations caused no statistically significant modifications ($p > 0.05$) in milk aroma, color, or consistency. However, the 100% concentration level induced a critical organoleptic trade-off, significantly compromising product flavor (decreasing from 8.6±0.54 to 7.4±0.19) and overall acceptability (decreasing from 8.6±0.54 to 7.4±0.24). In conclusion, the 75 % concentration of ethanolic clove extract represents the mathematically established optimum for dairy bio-preservation, achieving sufficient bacterial control – reducing the Total Aerobic Count to 4.42 log CFU/mL on Day 1 – without triggering consumer rejection.

Keywords: bovine milk, bio-preservation, clove extract, Total Aerobic Count, antibacterial efficacy, organoleptic attributes.**Екстракт гвоздики (*Syzygium aromaticum*) як натуральний біоконсервант у молоці: антимікробна та органолептична оцінка**В. М. Мохамед¹ | І. Е. Ібрагім² | А. А. Мохаммед¹¹ Факультет ветеринарної медицини, Університет Діялі, м. Баакуба, Ірак² Факультет ветеринарної медицини, Університет Куфи, м. Ан-Наджаф, Ірак

Харчова промисловість дедалі більше змагається за забезпечення біологічної безпеки продуктів, уникаючи використання штучних хімічних консервантів, які викликають серйозне занепокоєння щодо здоров'я споживачів. Метою цієї роботи було визначити поріг оптимальної концентрації спиртового екстракту гвоздики (*Syzygium aromaticum*), який забезпечує максимальний контроль чисельності бактерій в охолоджену коров'ячому молоці та успішне збереження його базових органолептичних показників. Для досягнення цього послідовно розведення спиртового та водного екстрактів оцінювали методом дифузії в агарі проти *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*, а зразки інокульованого молока, що зберігалися за температури 4±1°C, контролювали за показником загальної кількості аеробних бактерій разом із проведенням описового сенсорного аналізу за дев'ятибальною гедоністичною шкалою. Експериментальні результати засвідчили, що необроблена контрольна група демонструвала найвище мікробне навантаження, досягаючи 6,29 та 7,17 log КУО/мл на першу та другу добу зберігання відповідно. Навпаки, внесення екстрактів гвоздики призвело до значного, залежного від концентрації, зниження кількості бактерій ($p < 0,05$). Молоко з додаванням екстракту з максимальною концентрацією 100 % виявило найвищу антимікробну ефективність, забезпечуючи найнижчі показники загальної кількості аеробних бактерій – 3,65 та 4,36 log КУО/мл. Аналіз методом дифузії в агарі додатково підтвердив, що спиртовий екстракт має значно потужнішу антибактеріальну активність порівняно з водним варіантом, забезпечуючи більші зони затримки росту – 22 мм проти *Staphylococcus aureus* та 21 мм проти *Escherichia coli*, тоді як водний варіант сформував помірні зони діаметром 20 мм. Примітно, що за найнижчої концентрації 25 % жоден з екстрактів не виявив помітної пригнічувальної активності. Під час сенсорного оцінювання внесення спиртового екстракту в концентраціях 25 %, 50 % та 75 % не викликало статистично значущих змін ($p > 0,05$) аромату, кольору чи консистенції молока. Проте рівень концентрації 100 % призвів до критичного органолептичного компромісу, достовірно погіршивши смак продукту (зниження з 8,6±0.54 до 7,4±0.19 балів) та його загальну прийнятність (зниження з 8,6±0.54 до 7,4±0.24 балів). На завершення, 75 % концентрація спиртового екстракту гвоздики є математично обґрунтованим оптимумом для біоконсервації молочної продукції, оскільки забезпечує достатній мікробіологічний контроль – знижуючи загальну кількість бактерій до 4,42 log КУО/мл на першу добу зберігання – без ризику відторгнення продукту споживачами.

Ключові слова: коров'яче молоко, біоконсервація, екстракт гвоздики, загальна кількість аеробних бактерій, антибактеріальна ефективність, органолептичні показники.**Бібліографічний опис для цитування:** Мохамед В. М., Ібрагім І. Е., Мохаммед А. А. Екстракт гвоздики (*Syzygium aromaticum*) як натуральний біоконсервант у молоці: антимікробна та органолептична оцінка. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 86–94.

Introduction

Food is currently recognized not only for its nutritional value but also for its capacity to enhance overall well-being. According to [1], individuals actively seek to include healthy foods in their diets to promote longevity. The dairy sector illustrates this evolution through the development of novel processing techniques aimed at enhancing the dietary value of its derivatives. Milk derivatives are highly abundant in vital elements, containing essential minerals, fatty acids, proteins, lactose, and vitamins [2].

The worldwide sector for dairy-based drinks, although still niche compared to yogurt and plain milk, has experienced steady growth. Nutritional dairy drinks, including those containing probiotics and prebiotics, have become increasingly popular. These beverages generally fall into two categories: those formulated from fruit juices and dairy products (especially whey), and those fortified with bioactive compounds such as sterols, vitamins, peptides, prebiotics, polyphenols, probiotics, fish oil, and minerals [3]. Many flavored milk-based drinks contain ingredients such as almonds, chocolate, coffee, sugar, or various natural and artificial flavors and colors to enhance consumer appeal, particularly among children and teenagers. All these drinks undergo thermal processing, such as pasteurization or sterilization [4]. However, synthetic pigments and artificial flavors raise significant health concerns and potential hazards. Conversely, natural herbal remedies mitigate these risks while offering further nutritional advancements. Aromatic plants, for instance, garlic, cardamom, ginger, cinnamon, and clove, are readily available and can serve as effective natural flavor enhancers, improving taste profiles and lowering production expenditures compared to artificial flavorings.

Clove (*Syzygium aromaticum*), a member of the Myrtaceae family, is a widely esteemed spice, ranking second in global commerce [6]. It is a prominent medicinal plant owing to its ability to treat various diseases. Clove contains phytochemicals that are crucial for plant development and exhibits potent antibacterial, antifungal, antiviral, antioxidant, and anti-inflammatory effects [5]. Furthermore, it significantly reduces the risk of gastric ulcers by decreasing inflammation in the stomach lining, making it an effective natural remedy for gastrointestinal distress [9]. Similarly, cinnamon has been used for centuries to treat inflammation and improve digestion due to its powerful antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant properties [7]. One of the main reasons for cinnamon's medicinal benefits is its bioactive compounds, especially its essential oils, which contain high concentrations of eugenol, exhibiting high efficacy against a wide range of viruses, fungi, and bacteria [8].

The aim of the study

The purpose of this study was to determine the optimal concentration threshold of ethanolic clove (*Syzygium aromaticum*) extract to maximize bacterial control in refrigerated milk while preserving its baseline organoleptic attributes.

Materials and methods

Plant material and origin

Plant samples of clove (*Syzygium aromaticum*) were purchased from a local market in Diyala Province, Iraq, in 2026. The specimens were initially cleaned to remove foreign matter and subsequently pulverized into a fine powder utilizing an electric grinder (*Fig. 1*).



Fig. 1. Clove (*Syzygium aromaticum*) buds before and after the milling process

Preparation of clove (*Syzygium aromaticum*) extracts

The extraction procedure followed a modified method described by [10], utilizing two distinct solvents: distilled water and a 10 % ethanol solution. Initially, fresh clove buds were thoroughly washed, drained, and dried in a vacuum oven at 40°C for 12 hours. Once completely dehydrated, the buds were milled into a fine powder. This powder was continuously stirred with the respective solvent at room temperature for two hours. The resulting mixture was filtered through Whatman No. 1 filter paper. The filtrate was subsequently concentrated using a rotary evaporator at 40°C, and the residual solution was distilled to yield the primary aqueous extract.

In a parallel preparation aimed at evaluating an alternative extraction thermal profile, 10 grams of the ground clove powder were suspended in 100 mL of distilled water and stirred continuously using a magnetic stirrer for 30 minutes at 50°C. The suspension was subsequently centrifuged at room temperature for 10 minutes at a standardized speed. The supernatant was separated, and the remaining solid residue was removed by filtration through Whatman No. 1 paper to obtain the alternative hot aqueous extract. Both extract variants were

transferred to sterile amber glass containers and stored under refrigeration at $4\pm1^{\circ}\text{C}$ until further antimicrobial analysis.

To achieve a standardized stock solution (designated as 100 % concentration), the obtained clove extract was reconstituted in the respective solvent to yield a final stock concentration of 100 mg/mL. To ensure sufficiency for all experimental stages, this ratio was proportionally scaled up utilizing 100 g of the crude plant material per 1000 mL of solvent during the initial extraction phase for both the aqueous and ethanolic groups. Working concentrations were subsequently prepared via serial dilution of this standardized stock solution: 75 % (75 mL stock + 25 mL solvent), 50 % (50 mL stock + 50 mL solvent), and 25 % (25 mL stock + 75 mL solvent). All prepared working dilutions were transferred to sterile amber glass jars and stored under refrigerated conditions at $4\pm1^{\circ}\text{C}$ prior to antibacterial sensitivity testing on Mueller-Hinton agar against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Antimicrobial activity of clove extracts

The antibacterial properties of both ethanolic and aqueous clove extracts were evaluated using the agar well diffusion method, following the approach described by [11]. Two bacterial strains – the Gram-positive *Staphylococcus aureus* and the Gram-negative *Escherichia coli* – were selected to determine microbial sensitivity. To prepare the bacterial suspension, four to five colonies were isolated from each pure culture and transferred into test tubes containing 4 mL of sterile normal saline. The turbidity of each suspension was adjusted to match the 0.5 McFarland standard, corresponding to approximately 1×10^8 colony-forming units per milliliter (CFU/mL). A sterile cotton swab was immersed in the suspension and evenly spread across the surface of Mueller-Hinton agar plates. The plates were allowed to dry for 10 minutes, and wells were subsequently introduced. Following the application of the extracts, the plates were incubated at 37°C for 24 hours. The diameters of the zones of inhibition surrounding each well were measured and recorded in millimeters (mm), as outlined by [12].

Bacterial enumeration protocol for milk samples

Bacterial analysis of the milk samples was performed in strict accordance with the ISO 4833-1:2013 standard guidelines using the pour plate technique. Milk samples were collected aseptically into sterile containers and immediately transferred to storage at $4\pm1^{\circ}\text{C}$. Microbial enumeration was subsequently carried out on Day 1 and Day 2 of the storage period.

To prepare the serial dilutions, each milk sample was thoroughly agitated under a laminar flow hood to ensure a homogenous distribution of microorganisms. Sequentially, a 1 mL aliquot of the milk sample was aseptically transferred into a sterile test tube containing 9 mL of sterile 0.1 % peptone water to establish a 10^{-1} dilution, which was then vortexed for 10 seconds. This procedure was repeated by transferring 1 mL from the 10^{-1} dilution into a subsequent 9 mL of sterile diluent to obtain a 10^{-2} dilution. Serial tenfold dilutions were continued up to 10^{-6} , depending on the anticipated microbial load.

For the plating procedure, 1 mL of each prepared dilution was pipetted into sterile Petri dishes in triplicate. Approximately 15 mL of liquefied Plate Count Agar (PCA), cooled to $44\pm1^{\circ}\text{C}$, was dispensed into each dish. The plates were gently rotated to facilitate uniform mixing of the inoculum with the medium and allowed to solidify on a level surface. Upon solidification, the plates were inverted and incubated at 37°C for 48 hours.

Following the incubation period, Petri dishes containing between 30 and 300 colonies were selected for enumeration using an electronic colony counter. If no visible colonies were observed at the lowest dilution (10^{-1}), the result was documented as < 10 CFU/mL, representing the limit of detection. The total number of colony-forming units per milliliter (CFU/mL) of milk was calculated according to the following formula:

$$\text{CFU/mL} = \frac{C \times D}{V}$$

where:

- C is the number of colonies counted on the selected plate;
- D is the reciprocal of the dilution factor;
- V is the volume of the inoculum plated (1 mL).

The obtained data were subsequently transformed into logarithmic form ($\log_{10}$ CFU/mL) and documented for each sample on Day 1 and Day 2 of cold preservation.

To ensure the reliability of the method, rigorous quality control protocols were implemented. A negative control consisting of the sterile diluent plated on Plate Count Agar (PCA) was included in each analytical batch to monitor potential contamination. Concurrently, *Escherichia coli* ATCC 25922 was utilized as a positive control strain with a known countable range to validate medium performance and verify the consistency of incubation conditions.

Preparation of clove-flavored milk and experimental groups

To ensure bacteriological safety, 20 fresh bovine milk samples were subjected to thermal treatment. Initially, sugar was dispersed into the milk samples at a ratio of 9 % (w/v) at 50°C under continuous agitation to ensure complete dissolution, following the method described by [13]. The mixtures were subsequently heated to 90°C and held for 5 minutes. Following heat treatment, the milk was rapidly cooled to 45°C to prevent thermal decomposition of its nutritional constituents.

The heat-treated milk was then inoculated with the ethanolic extract of clove (*Syzygium aromaticum*). Five distinct experimental treatment groups were established based on the final concentration of the extract in the milk matrix:

- *Control group*: Untreated milk (0 mg/mL, no extract added);
- *25 % Extract group*: 1 mL of a 25 mg/mL dilution (prepared from 25 mL stock + 75 mL alcohol) added to 100 mL of milk, yielding a final concentration of 0.25 mg/mL;
- *50 % Extract group*: 1 mL of a 50 mg/mL dilution (prepared from 50 mL stock + 50 mL alcohol)

added to 100 mL of milk, yielding a final concentration of 0.50 mg/mL;

- **75 % Extract group:** 1 mL of a 75 mg/mL dilution (prepared from 75 mL stock + 25 mL alcohol) added to 100 mL of milk, yielding a final concentration of 0.75 mg/mL;

- **100 % Extract group:** 1 mL of the pure stock extract (100 mg/mL) added to 100 mL of milk, yielding a final concentration of 1.00 mg/mL.

Each treated milk sample was thoroughly homogenized under aseptic conditions and transferred into sterile, transparent container vials. All samples were stored under refrigeration at $4\pm1^{\circ}\text{C}$ for 2 days to monitor and evaluate the preserving effect of the clove extract on the shelf life of the milk product.

Organoleptic Evaluation

Sensory evaluation of the milk samples was performed by a trained panel consisting of five expert examiners from the veterinary medical staff of the Public Health Division. While larger consumer panels are typically used for market preference studies, a small, highly trained panel of five to ten assessors is scientifically validated for descriptive organoleptic analysis of dairy and milk-based products, ensuring low intra-panel variability. The panelists underwent rigorous sensory training and were thoroughly acclimated to the specific evaluation criteria.

Prior to sensory analysis, each milk sample was coded with a unique barcode to ensure a blind study design. Following the evaluation protocols outlined by [14], the specimens were assessed for flavor, odor, color, texture, and overall acceptability. A nine-point hedonic scale was utilized for scoring, ranging from 1 (dislike extremely) to 9 (like extremely). To eliminate carryover effects and ensure data accuracy, panelists thoroughly rinsed their mouths with purified water between samples, and sessions were conducted at staggered time intervals. Each panel member recorded evaluations independently in isolated booths to ensure objectivity and uniformity in the outcomes, in accordance with [13].

Statistical analysis

The experimental data were subjected to statistical analysis utilizing the SAS software package (Statistical Analysis System, version 9.1). Differences among treatment means were evaluated via two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Least Significant Difference (LSD) post-hoc test for multiple comparisons. All data are presented as mean $\pm$ standard error (SE). Statistical significance was defined a priori at a p-value < 0.05 [15].

Results and discussion

Microbiological analysis of milk during storage

The Total Aerobic Count (TAC) serves as a critical indicator of product shelf life, given that elevated levels of these microorganisms inevitably accelerate product spoilage. To determine the preservation capacity of the plant material, the variations in the TAC of milk samples treated with distinct concentrations of ethanolic clove

extract during refrigerated storage were systematically evaluated, as summarized in **Table 1**.

Table 1

Effect of different concentrations of ethanolic clove extract on the Total Aerobic Count (log CFU/mL) of milk samples

Concentration	Day 1	Day 2
Control	6.29 ^a	7.17 ^a
25%	6.08 ^a	7.02 ^a
50%	5.65 ^b	6.19 ^b
75%	4.42 ^c	4.81 ^c
100%	3.65 ^d	4.36 ^d
LSD	0.19	

Note: different lowercase superscript letters within the same column indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

At the initial evaluation points, the untreated control samples exhibited the highest microbial loads, reaching 6.29 and 7.17 log CFU/mL on Day 1 and Day 2, respectively. Conversely, data analysis presented in **Table 1** confirms that the incorporation of clove extracts resulted in a significant, concentration-dependent reduction in bacterial counts ($p \leq 0.05$). Milk samples flavored with 100 % clove extract demonstrated the highest antimicrobial efficacy, maintaining the lowest microbial profiles at 3.65 and 4.36 log CFU/mL.

To visually track the dynamics of this inhibitory effect over the cold storage period, a comparative graphical projection of the concentrations against time intervals was established, as illustrated in **Fig. 2**.

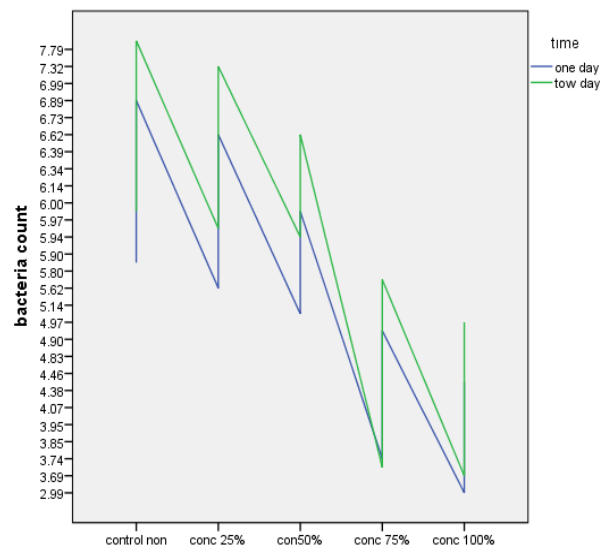


Fig. 2. Effect of different concentrations (25 %, 50 %, 75 %, and 100 %) of ethanolic clove (*Syzygium aromaticum*) extract over different storage periods (Day 1 and Day 2) on the Total Aerobic Count (log CFU/mL) of milk

The linear trends in **Fig. 2** illustrate that while the 25 % extract concentration showed non-significant divergence from the control group, concentrations of 50 % and above achieved a sharp, statistically validated drop in the log values. The post-hoc Least Significant

Difference (LSD) test established distinct homogenous groups, showing that doubling the extract strength progressively intensifies the preservation effect.

To provide primary microbiological proof of this suppression, the physical colony growth on the respective culture media was documented, as presented in **Fig. 3**.

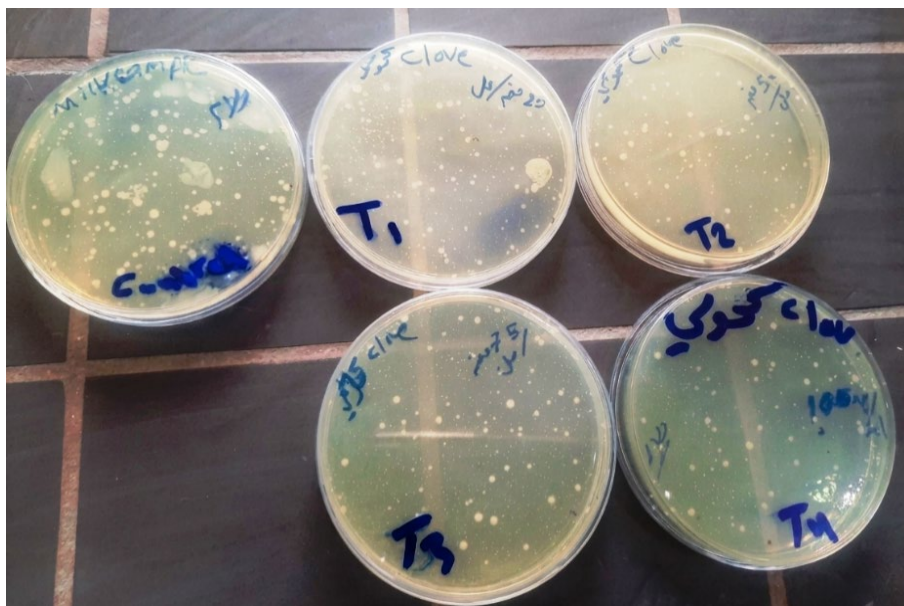


Fig. 3. Total Aerobic Count (TAC) plates of milk samples after treatment with different concentrations of ethanolic clove (*Syzygium aromaticum*) extract (Control: untreated; T1: 25 %; T2: 50 %; T3: 75 %; T4: 100 % concentration)

The visual comparison of the Petri dishes in **Fig. 3** confirms a profound reduction in colony-forming units, shifting from a dense, confluent bacterial lawn in the control plate to isolated, sparse colonies in the T3 and T4 treatment groups. This direct visualization perfectly corroborates the numerical parameters verified in Table 1, demonstrating that the ethanolic extract structurally inhibits the logarithmic replication phase of aerobic flora in the milk matrix.

Antibacterial efficacy of clove (Syzygium aromaticum) extracts

To establish the baseline sensitivity of specific bacterial profiles before milk application, the antimicrobial efficiency of two distinct variants of clove extracts (aqueous and ethanolic) was evaluated against prominent Gram-positive and Gram-negative indicators, with the resulting zone configurations shown in **Fig. 4**.

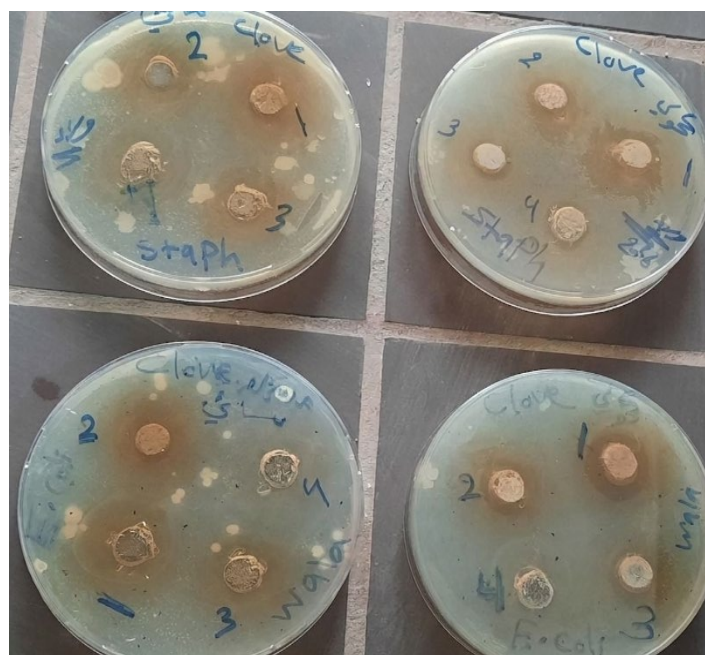


Fig. 4. Antibacterial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) extracts evaluated via the agar well diffusion method against *Staphylococcus aureus* (left plates) and *Escherichia coli* (right plates) using ethanolic (top) and aqueous (bottom) extracts at various concentrations (1: 100 %, 2: 75 %, 3: 50 %, 4: 25 %)

The experimental results from the well diffusion assay illustrated in **Fig. 4** indicated that the ethanolic extract exhibited a substantially stronger antibacterial effect against both bacterial species compared to the aqueous extract ($p \leq 0.05$). Notably, at the lowest evaluated concentration (25 %), neither the aqueous nor the

ethanolic extract displayed any detectable inhibitory activity (0 mm) against either of the tested microbial species. To perform a rigorous comparative analysis of the extraction yield efficacy specifically against the Gram-positive target, the measured inhibition diameters for *Staphylococcus aureus* were plotted in **Fig. 5**.

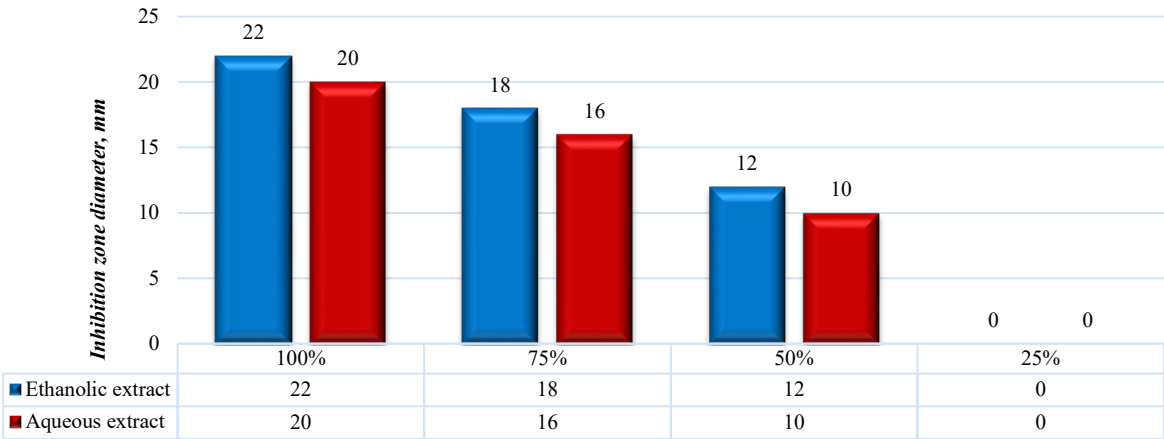


Fig. 5. Comparative antibacterial effect of ethanolic (alcoholic) and aqueous clove (*Syzygium aromaticum*) extracts at various concentrations against *Staphylococcus aureus*

As detailed in the comparative bar chart in **Fig. 5**, the ethanolic extract demonstrated a highly significant antibacterial influence against *S. aureus*, producing superior inhibition zones of 22 mm at the 100 % concentration level, whereas the aqueous extract displayed a moderate reduction diameter of 20 mm. This

variance underscores the higher solubility of hydrophobic phenolic compounds in organic solvents. To verify whether this susceptibility trend remains consistent when encountering the structural obstacles of Gram-negative cell walls, a parallel assessment was performed for *Escherichia coli*, as charted in **Fig. 6**.

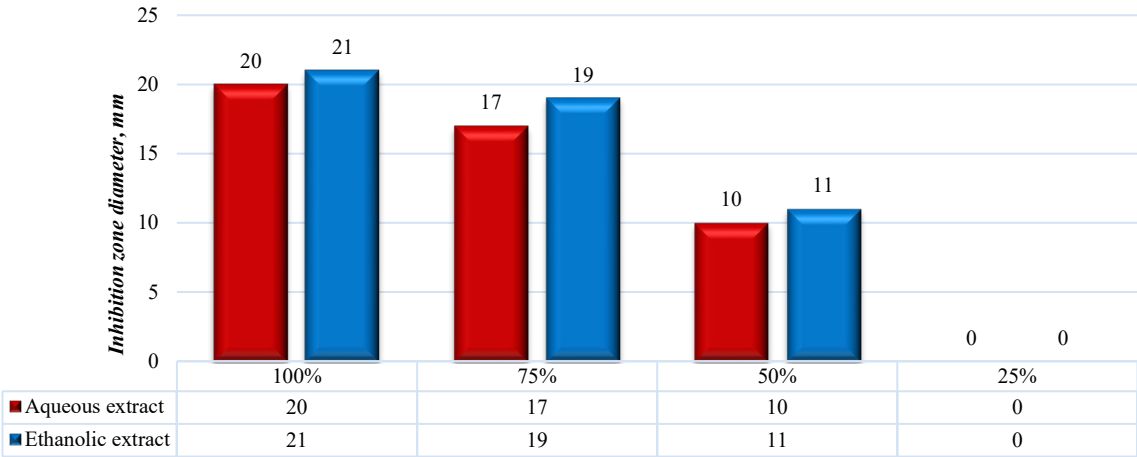


Fig. 6. Comparative antibacterial effect of ethanolic (alcoholic) and aqueous clove (*Syzygium aromaticum*) extracts at various concentrations against *Escherichia coli*

The data represented in **Fig. 6** show a similar trend for *E. coli*, with the ethanolic extract generating a peak zone of 21 mm compared to 20 mm for the aqueous variant at maximum strength.

The findings of this research align with prior investigations conducted by [16], which demonstrated that the ethanolic extract of clove exhibits clear inhibition zones against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, indicating robust antimicrobial activity. This suggests that the inhibitory activity depends primarily on the chemical nature and constituents of the

extract itself rather than on structural differences in the bacterial cell walls. Consequently, several dairy matrices have been the focus of clove incorporation in previous literature, including ice cream [17], probiotic yogurt powder [18], fermented milk beverages [19], and soft cheese [20].

The high phenolic content of clove induces the coagulation of bacterial cellular components, exerting a potent germicidal effect against numerous pathogenic microorganisms by disrupting active transport mechanisms, the proton motive force, and

electron flow [5]. This mechanism of action emphasizes the potency of ethanolic clove extract in suppressing microbial proliferation and supports its potential application as a natural antimicrobial agent in food preservation systems. Furthermore, [21] confirmed these findings, demonstrating that ethanolic extracts possess higher efficacy compared to aqueous variants. This enhanced efficiency is further supported by an earlier study conducted by [22], which indicated that the increased solubility of plant-derived bioactive compounds in polar organic solvents is a key determinant of their antimicrobial capacity.

A previous study by [23] also demonstrated that both ethanolic and aqueous clove extracts exhibit substantial antibacterial effects, specifically against *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli*. The choice of extraction solvent significantly influences the overall yield of bioactive molecules; ethanol is documented to be more efficient than water due to the superior solubility of hydrophobic phenolic substances in organic media. Previous literature has similarly established that clove extracts prepared with ethanol have the potential to enhance both the nutritional value and health-promoting properties of milk and derivative dairy products [24]. Additionally, related investigations conducted by [25] demonstrated the efficacy of ethanolic extracts of *Syzygium aromaticum* at a concentration of 10 mg/mL against several pathogenic bacteria, including *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus cereus*, yielding inhibition zones

of 15.8 mm, 11.9 mm, 13.4 mm, and 14.6 mm, respectively.

Furthermore, [26] highlighted that clove has garnered considerable attention for its pivotal role in mitigating antimicrobial resistance. As drug-resistant bacterial infections become increasingly prevalent, the capacity of clove constituents to enhance the efficacy of traditional antibiotics positions it as an essential complementary therapeutic agent. Research indicates that clove can help restore antibiotic activity against resistant pathogens, such as *Proteus* spp., which are frequently associated with urinary tract and wound infections. By increasing bacterial sensitivity to conventional antibiotics, clove aids in combating multidrug-resistant strains, thereby offering a viable contribution to addressing the escalating global challenge of antimicrobial resistance within healthcare systems.

Organoleptic assessment of flavored milk samples

While achieving microbial stability is a primary objective in bio-preservation, the incorporation of potent botanical extracts must not degrade the baseline consumer characteristics of the beverage. To determine the practical viability of the formulation, the organoleptic attributes of milk flavored with various concentrations of ethanolic clove extract – specifically evaluating aroma, flavor, color, texture (consistency), and overall acceptability – were systematically monitored by the expert panel and are summarized in **Table 2**.

Table 2
Organoleptic characteristics of flavored milk samples supplemented with different concentrations of ethanolic clove extract, *mean*±*SE*.

Sensory attributes	Aroma	Flavor	Color	Consistency	Overall acceptability
Control	8.4±0.54 ^a	8.6±0.54 ^a	8.6±0.54 ^a	8.2±0.44 ^a	8.6±0.54 ^a
25% Extract	8.4±0.24 ^a	8.6±0.31 ^a	8.6±0.19 ^a	8.4±0.24 ^a	8.6±0.19 ^a
50% Extract	8.0±0.44 ^a	8.4±0.24 ^a	8.4±0.19 ^a	8.4±0.24 ^a	8.4±0.19 ^a
75% Extract	7.8±0.19 ^a	8.4±0.24 ^a	8.2±0.19 ^a	8.4±1.41 ^a	8.0±0.31 ^a
100% Extract	7.6±0.24 ^a	7.4±0.19 ^b	7.8±0.19 ^a	8.6±0.18 ^a	7.4±0.24 ^b
LSD	1.18	1.87	1.17	0.85	0.73
Significance	NS	p<0.05	NS	NS	p<0.05

Note: NS: non-significant (p>0.05). Different lowercase superscript letters within the same column indicate statistically significant differences (p<0.05).

The experimental results compiled in **Table 2** revealed no statistically significant differences (p>0.05) in the monitored sensory properties compared to the untreated control group, with the sole exceptions of flavor and overall acceptability scores at the maximum (100 %) concentration level. This study aligns with previous literature, such as the report by [20], which documented excellent sensory retention in beef cuts and soft cheeses processed with clove and alternative herbal extracts. Consistent with those reports, the current data suggest that ethanolic clove extract can be successfully utilized to enhance the organoleptic attributes of various food matrices, including dairy-based beverages. Throughout the storage period, the inclusion of the extract at any evaluated concentration did not notably alter the visual color values of the milk. This observation is in close agreement with [13], who reported that milk-based beverages fortified with plant extracts exhibit minimal or negligible color modifications. Additionally, as noted by [27], clove has a well-established history of

use as a natural preservative in various food matrices, serving as a viable alternative to synthetic chemical additives.

The compiled experimental outcomes indicated that while the 100 % clove extract concentration exhibited the most robust antibacterial effect, it simultaneously exerted a negative impact on the sensory attributes of the milk matrix, particularly reducing overall acceptability scores due to an over-concentrated flavor profile. In contrast, the 75% concentration demonstrated effective antibacterial efficacy while successfully maintaining acceptable sensory quality. Therefore, selection of the optimal extract concentration must be based on a balanced evaluation of both microbiological stability and sensory quality, rather than prioritizing antibacterial potency alone. From both industrial manufacturing and consumer perspectives, natural preservatives must effectively inhibit bacterial proliferation while preserving the desired organoleptic characteristics of the product. For this reason, the 75 % concentration of ethanolic clove extract

was determined to be optimal and most suitable for commercial application, achieving sufficient bacterial control without compromising consumer acceptance.

The compiled experimental outcomes indicated that while the 100 % clove extract concentration exhibited the most robust antibacterial effect, it simultaneously exerted a negative impact on the sensory attributes of the milk matrix, particularly reducing overall acceptability scores due to an over-concentrated flavor profile. In contrast, the 75 % concentration demonstrated effective antibacterial efficacy while successfully maintaining acceptable sensory quality. Therefore, selection of the optimal extract concentration must be based on a balanced evaluation of both microbiological stability and sensory quality, rather than prioritizing antibacterial potency alone. From both industrial manufacturing and consumer perspectives, natural preservatives must effectively inhibit bacterial proliferation while preserving the desired organoleptic characteristics of the product. For this reason, the 75 % concentration of ethanolic clove extract was determined to be optimal and most suitable for commercial application, achieving sufficient bacterial control without compromising consumer acceptance.

Based on the established optimal parameters, several prospective recommendations for future research can be outlined:

- To comprehensively understand the long-term preserving capacity of ethanolic clove extract, future investigations should evaluate its potential to extend the refrigerated storage life of dairy products over a prolonged period of one to two weeks.
- Recent literature supports the development of nanotechnology-based delivery systems for clove extracts; such nanoparticles could significantly improve the absorption and stability of eugenol, maximize targeted antibacterial efficacy, and effectively bypass microbial drug resistance pathways.
- Additional rigorous screening is needed to evaluate potential synergistic interactions between clove extracts and standard pharmaceutical antibiotics, which could significantly augment conventional antimicrobial effectiveness in healthcare and food preservation systems.

Scientific novelty statement

While the antimicrobial properties of clove extract are widely recognized, this study provides the first systematic evidence establishing a precise optimal concentration threshold (75 %) that maximizes the reduction of bacterial loads in refrigerated milk – achieving a decrease from 6.29 to approximately 4.42 log CFU/mL – while simultaneously preserving all key organoleptic attributes (flavor, aroma, color, and consistency) without statistically significant differences from the untreated control. Furthermore, this investigation uniquely demonstrates that concentrations exceeding this threshold (100 %), despite offering the maximum antibacterial potency (inhibition zones of 22 mm against *Staphylococcus aureus* and 21 mm against *Escherichia coli*), create a critical organoleptic trade-off by significantly compromising flavor profiles and overall consumer acceptability. These findings deliver a practical,

evidence-based solution for the dairy industry aimed at replacing synthetic chemical additives with natural plant-derived alternatives without triggering consumer rejection.

Conclusions

The agar well diffusion analysis demonstrated that the ethanolic clove (*Syzygium aromaticum*) extract possesses a significantly more potent antibacterial activity compared to the aqueous variant, yielding maximum zones of inhibition of 22 mm against *Staphylococcus aureus* and 21 mm against *Escherichia coli* at 100 % concentration, whereas both extracts displayed no inhibitory activity (0 mm) at 25 % concentration. In the sensory evaluation, the incorporation of the ethanolic extract at concentrations of 25 %, 50 %, and 75 % caused no statistically significant modifications ($p>0.05$) in milk aroma, color, or consistency compared to the untreated control group. However, the maximum 100 % concentration level induced a critical organoleptic trade-off, significantly compromising the product flavor (decreasing from 8.6 ± 0.54 to 7.4 ± 0.19) and overall acceptability (decreasing from 8.6 ± 0.54 to 7.4 ± 0.24). Consequently, the 75 % concentration was established as the optimal formulation for bio-preservation, as it successfully balanced high microbiological efficacy – achieving a substantial reduction in the Total Aerobic Count from 6.29 to 4.42 log CFU/mL on Day 1 and from 7.17 to 4.81 log CFU/mL on Day 2 of refrigerated storage – with the complete retention of acceptable product sensory quality.

DECLARATIONS

Ethical Statement

Not applicable. This study was conducted entirely *in vitro* using bacterial strains and bovine milk samples, and did not involve any live animal subjects or human tissues.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

None.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The authors declare that no generative AI or AI-assisted technologies were used during the preparation, writing, translation, or language polishing of this manuscript. The final content was fully authored and reviewed by the authors, who take sole responsibility for the work.

References

1. Özer, B. H., & Kirmaci, H. A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00547.x>

2. Mudgil, D., & Barak, S. (2019). Dairy-based functional beverages. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Milk-based beverages* (pp. 67–93). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815504-2.00003-7>
3. Gomes, I. A., Venâncio, A., Lima, J. P., & Freitas-Silva, O. (2021). Fruit-based non-dairy beverage: A new approach for probiotics. *Advances in Biological Chemistry*, 11(6), 302–330. <https://doi.org/10.4236/abc.2021.116021>
4. Singh, B., Khamrui, K., Lodh, J., Debnath, A., & Prasad, W. (2017). Selection of levels of ingredients for the preparation of milk-coconut sweet based on sensory and instrumental colour attributes. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 36(2), 106–111. <https://doi.org/10.18805/ajdfr.v36i02.7952>
5. Yassin, M. T., Al-Askar, A. A., Mostafa, A. A.-F., & El-Sheikh, M. A. (2020). Bioactivity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry extracts as potential antimicrobial and anticancer agents. *Journal of King Saud University - Science*, 32(8), 3273–3278. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.09.009>
6. Liñán-Atero, R., Aghababaei, F., García, S. R., Hasiri, Z., Ziogkas, D., Moreno, A., & Hadidi, M. (2024). Clove essential oil: Chemical profile, biological activities, encapsulation strategies, and food applications. *Antioxidants*, 13(4), 488. <https://doi.org/10.3390/antiox13040488>
7. Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), 90–96. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(14\)60215-x](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(14)60215-x)
8. Taleuzzaman, M., Imam, S. S., & Gilani, S. J. (2020). Clove oil/eugenol as the nanotechnological perspective for healthcare applications. In S. S. Imam, S. J. Gilani, & M. Taleuzzaman (Eds.), *Nanomedicine for bioactives* (pp. 413–430). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1664-1_16
9. El-Saber Batiha, G., Alkazmi, L. M., Wasef, L. G., Beshbishy, A. M., Nadwa, E. H., & Rashwan, E. K. (2020). *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. *Biomolecules*, 10(2), 202. <https://doi.org/10.3390/biom10020202>
10. El-Maati, M. F. A., Mahgoub, S. A., Labib, S. M., Al-Gaby, A. M. A., & Ramadan, M. F. (2016). Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. *European Journal of Integrative Medicine*, 8(4), 494–504. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.02.006>
11. Hemalatha, R., Nivetha, P., Mohanapriya, C., Sharmila, G., Muthukumaran, C., & Gopinath, M. (2015). Phytochemical composition, GC-MS analysis, in vitro antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 1189–1198. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2108-5>
12. Mohamed, W. M., Hassoon, S. J., ALAni, K. A. M. A., & Ibrahim, A. K. (2021). Antibacterial effect of zinc oxide nanoparticle against some bacteria isolated from bovine milk of Diyala province. *Biochemical and Cellular Archives*, 21(1), 367–371. <https://connectjournals.com/03896.2021.21.367>
13. Habib, E., Awad, S., Shamsia, S., & Ziena, H. (2019). Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of bio drinking yoghurt fortified with *Salvia officinalis* extract. *Asian Journal of Biological Sciences*, 12(3), 430–436. <https://doi.org/10.3923/ajbs.2019.430.436>
14. Clark, S., Costello, M., Drake, M., & Bodyfelt, F. (Eds.). (2009). *The sensory evaluation of dairy products* (2nd ed.). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77408-4>
15. SAS Institute Inc. (2010). *SAS/STAT user's guide for personal computer* (Release 9.13) [Computer software]. SAS Institute Inc.
16. Saad, A. M., Mohamed, A. S., El-Saadony, M. T., & Sitohy, M. Z. (2021). Palatable functional cucumber juices supplemented with polyphenols-rich herbal extracts. *LWT*, 148, 111668. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111668>
17. Ghazizadeh, S., Pourahmad, R., & Nateghi, L. (2021). Use of alcoholic extracts of chicory, clove and pomegranate peel in production of functional ice-cream with desirable quality. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 11(1), 11–20. <https://sid.ir/paper/968793/en>
18. Saleena, L. A. K., Yusof, Y. A., Song, A. A.-L., In, L. L. A., Nyam, K. L., & Pui, L. P. (2024). Development of clove extract-fortified functional yoghurt powder using spray: drying. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(4), 2776–2796. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02358-4>
19. Soares Farias, P. K., Fonseca, F. S. A. d., Martins, E. R., Sales, M. S. M., Leite, A. S., Oliveira, F. B. S. d., Mendes, P. M., Azevedo, A. M., Brandi, I. V., Durães, R. R., Ravnjak, J. M. A., Souza, C. N. d., Souto, C. d. A., & Almeida, A. C. d. (2022). The addition of *Syzygium aromaticum* essential oil preserves the microbiological and physicochemical quality of the fermented milk beverage during storage. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, 9(5), 114–120. <https://doi.org/10.22161/ijaers.95.9>
20. Ahmed, L. I., Ibrahim, N., Abdel-Salam, A. B., & Fahim, K. M. (2021). Potential application of ginger, clove and thyme essential oils to improve soft cheese microbial safety and sensory characteristics. *Food Bioscience*, 42, 101177. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101177>
21. Sharma, M., Mohan, V., Abraham, M., Joshy, P. J., & Reghuvaran, D. K. (2011). Antimicrobial screening of different extracts of South Indian medicinal plants of Meliaceae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(5), 688–695. <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/57C2E4A18748>
22. Houghton, P., & Raman, A. (2012). *Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts* (Softcover reprint of the original 1st ed. 1998). Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5809-5>
23. Liu, J., Mahmood, M. S., Abbas, R. Z., Dillawar, A., Nawaz, Z., Luqman, M., Abbas, A., Rehman, A. U., & Rafique, A. (2021). Therapeutic appraisal of ethanolic and aqueous extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) and garlic (*Allium sativum*) as antimicrobial agent. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 58(1), 245–251.
24. Indiarito, R., Herwanto, J. A., Filianty, F., Lembong, E., Subroto, E., & Muhammad, D. R. A. (2024). Total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and characteristics of a chocolate beverage incorporated with encapsulated clove bud extract. *CyTA - Journal of Food*, 22(1). <https://doi.org/10.1080/19476337.2024.2329144>
25. Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., & Bakri, M. M. (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>
26. Al-Tawalbeh, D. M., Alawneh, J. M., Momani, W., & Mayyas, A. (2025). Comparative antibacterial activity of clove extract against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 25(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12906-024-04740-7>
27. Abdul Aziz, A. H., Rizkiyah, D. N., Qomariyah, L., Irianto, I., Che Yunus, M. A., & Putra, N. R. (2023). Unlocking the full potential of clove (*Syzygium aromaticum*) spice: An overview of extraction techniques, bioactivity, and future opportunities in the food and beverage industry. *Processes*, 11(8), 2453. <https://doi.org/10.3390/pr11082453>

ORCID

- W. M. Mohamed  <https://orcid.org/0009-0007-2144-8655>
 I. E. Ibrahim  <https://orcid.org/0000-0001-7550-7963>
 A. A. Mohammed  <https://orcid.org/0009-0003-3647-8612>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Epidemiology and antimicrobial resistance of dominant *Salmonella* serotypes in Iraqi broiler hatcheries: a comprehensive One Health analysis

H. I. Ali 

Article info

Correspondence Author
H. I. Ali
E-mail:
hiba.i@uodiyala.edu.iq

College of Veterinary
Medicine, University of
Diyala,
Al-Muradia, Old Baghdad-
Baqubah Road, Baqubah,
32001, Diyala, Iraq

Citation: Ali, H. I. (2026). Epidemiology and antimicrobial resistance of dominant *Salmonella* serotypes in Iraqi broiler hatcheries: a comprehensive One Health analysis. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 95–101. doi: 10.31210/spi2026.29.02.14

Hatcheries are critical points for *Salmonella* dissemination, and the distribution of its serotypes significantly impacts public health. Despite this global threat, surveillance deficits remain regarding these foodborne pathogens within regional production environments. To address these gaps, this investigation evaluated the occurrence rates, serotype distribution, and antimicrobial resistance profiles of bacterial isolates recovered from commercial broiler production facilities. A multi-facility cross-sectional study was conducted from March to October 2023, encompassing 450 specimens stratified equally into 150 chick cecal contents, 150 eggshells, and 150 worker hand swabs. Microbiological isolation followed international horizontal protocols. Biochemical profiling and slide agglutination methods were employed for serovar identification, while phenotypic susceptibility profiles were determined utilizing the disk diffusion method under clinical laboratory criteria. The analysis detected an overall pathogen prevalence of 8.4 %, corresponding to 38 positive samples out of the 450 tested. Specific isolation rates were distributed across chick ceca at 12.0 % (18 positive samples), eggshells at 7.3 % (11 positive samples), and worker hands at 6.0 % (9 positive samples). Serological typing revealed a predominance of *Salmonella* Enteritidis at 34.2 % (13 isolates) and *Salmonella* Kentucky at 26.3 % (10 isolates), each exhibiting alarming multidrug resistance at 38.5 % (5 isolates) and 60.0 % (6 isolates), respectively. Notably, the recovered *Salmonella* Kentucky strains demonstrated concerning ciprofloxacin resistance at 40.0 % (4 isolates) and cefotaxime resistance at 20.0 % (2 isolates). Both dominant serotypes were consistently recovered from all three sample matrices, demonstrating active circulation within the facilities. In conclusion, commercial broiler facilities serve as reservoirs for highly resistant multidrug-resistant strains. The concurrent presence of a classic egg-associated pandemic variant and an environmentally durable, fluoroquinolone-resistant clone represents a severe threat to food safety. This scenario calls for the immediate implementation of an integrative national health framework incorporating environmental biosecurity measures, strict antimicrobial stewardship, and ongoing systematic monitoring across the production continuum.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Kentucky, Iraq, hatchery, multidrug resistance, One Health, antimicrobial resistance.

Епідеміологія та антимікробна резистентність домінуючих серотипів *Salmonella* в бройлерних інкубаторах Іраку: комплексний аналіз «Єдиного здоров'я»

X. I. Ali

Факультет ветеринарної
медицини, Університет
Діялі,
м. Баакуба, Ірак

Птахівничі інкубатори є критичними ланками поширення *Salmonella*, що безпосередньо впливають на епідемічне благополуччя населення. Попри глобальну загрозу сальмонельозу, на регіональному рівні досі бракує комплексного моніторингу біологічних властивостей цих харчових патогенів у промисловому птахівництві. Це дослідження мало на меті заповнити наявні прогалини в знаннях щодо контамінації *Salmonella* в бройлерних інкубаторах Іраку. Дослідження тривало з березня по жовтень 2023 року й охоплювало 450 зразків, які рівномірно розподілили за трьома категоріями: вміст сліпої кишки добових курчат (150 зразків), яєчна шкаралупа з вивідних лотків (150 зразків) та мазки з рук персоналу (150 зразків). Мікробіологічний скринінг здійснювали згідно з чинними міжнародними протоколами щодо горизонтальних методів виявлення патогенів. Для ідентифікації сероварів застосовували класичне біохімічне профілювання та реакцію слайд-аглютинації, тоді як чутливість до протимікробних препаратів визначали диско-дифузійним методом за критеріями Інституту клінічних та лабораторних стандартів. За результатами аналізу загальна частота виділення патогену становила 8,4 % (38 позитивних знахідок із 450 протестованих). Зокрема, рівень контамінації вмісту сліпої кишки курчат сягнув 12,0 % (18 зразків), яєчної шкаралупи – 7,3 % (11 зразків), а мазків з рук працівників – 6,0 % (9 зразків). За результатами серотипування встановлено абсолютне домінування двох варіантів: *Salmonella* Enteritidis – 34,2 % (13 ізолятів) та *Salmonella* Kentucky – 26,3 % (10 ізолятів). Обидва штами продемонстрували критично високі показники множинної стійкості до ліків (мультирезистентності), які склали 38,5 % (5 ізолятів) та 60,0 % (6 ізолятів) відповідно. Особливе занепокоєння викликає виявлена у штамів *Salmonella* Kentucky резистентність до ципрофлоксацину на рівні 40,0 % (4 ізоляти) та до цефотаксиму на рівні 20,0 % (2 ізоляти). Постійне виділення обох домінуючих серотипів з усіх типів біологічного матеріалу свідчить про їхню активну циркуляцію в інкубаторах. Таким чином, сучасні бройлерні підприємства є стійкими резервуарами небезпечних мультирезистентних штамів сальмонел. Одночасна присутність класичного пандемічного серовару, пов'язаного з яйцепродуктами, та екологічно витривалого, стійкого до фторхінолонів клону створює серйозну подвійну загрозу для безпеки харчових продуктів. Ця ситуація вимагає негайного впровадження інтегрованої національної стратегії в рамках концепції «Єдине здоров'я», яка передбачає посилення заходів безпеки виробничого середовища, суворий контроль за використанням антибіотиків та безперервний систематичний моніторинг на всіх етапах птахівничого континууму.

Ключові слова: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Kentucky, Ірак, інкубатор, мультирезистентність, Єдине здоров'я, антимікробна резистентність.



Бібліографічний опис для цитування: Ali X. I. Епідеміологія та антимікробна резистентність домінуючих серотипів *Salmonella* в бройлерних інкубаторах Іраку: комплексний аналіз «Єдиного здоров'я». *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 95–101.

Introduction

Non-typhoid *Salmonella* (NTS) is a leading foodborne pathogen globally, causing approximately 95 million cases and 50,000 deaths annually [1]. The primary source of human NTS infection is poultry and poultry-derived products, which significantly contributes to the global disease burden [2]. The diverse serotypes and epidemiology of salmonellosis are closely interlinked. Each serotype, characterized by its unique virulence, host predilection, and antimicrobial resistance (AMR), directly affects salmonellosis transmission dynamics and overall public health [3].

A commercial broiler hatchery represents a key control point, and potentially a point of amplification, within the hatchery segment of the poultry production continuum [13]. Subclinically infected breeder flocks can introduce *Salmonella* into this system through vertically transmitted, contaminated eggs [6]. The hatching phase, with its warm and humid conditions, provides an optimal environment for bacterial proliferation.

The *Salmonella*-laden dust and fluff aerosolized during the pipping phase creates a highly infectious environment, leading to massive colonization of immunologically naive chicks. These chicks, when transferred to grow-out facilities, become *Salmonella* reservoirs and shedders, effectively undermining infection control at the very beginning of the production chain [14].

In Iraq, the poultry industry plays an important role in the agricultural economy as well as national food security. Unfortunately, it remains severely affected by outbreaks of infectious diseases that impact both the economy and public health [4]. Iraq's specific socio-economic contexts, climatic and husbandry stressors, high flock density, and the extensive preventive use of antibiotics create unique ecological niches that select for certain highly resilient *Salmonella* serotypes [5, 6].

In the greater Middle East and North Africa region, certain serotypes, such as *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Kentucky, have emerged and become dominant; however, major surveillance gaps at the hatchery level in Iraq still need to be addressed [7, 8].

Salmonella Enteritidis, the leading cause of foodborne illness, is a global pandemic clone that colonizes the avian reproductive tract and contaminates the internal contents of eggs [9]. In contrast, the environmentally resilient and multidrug-resistant *Salmonella* Kentucky clone poses a serious threat to infection treatment, especially due to its robust association with fluoroquinolone resistance [10] and the challenges it presents for risk assessment.

The aim of the study

This study aimed to bridge the existing knowledge gaps regarding *Salmonella* contamination within Iraq's broiler hatcheries.

To achieve this, the investigation set out to document: i) the prevalence and distribution of *Salmonella* serotypes across chicks, eggshells, and hatchery personnel, and ii) the specific patterns of antimicrobial resistance and multidrug resistance (MDR) among the recovered

isolates, highlighting their critical implications for both public health and veterinary sectors.

Materials and methods

Study Design and Sample Collection

A cross-sectional study was conducted over an eight-month period from March to October 2023. The study encompassed five of the largest commercial broiler hatcheries in Iraq, located within the central geographical regions of the country, specifically in the provinces of Baghdad, Babil, and Wasit. The selection of these specific broiler hatcheries was based on their market significance and their extensive distribution of day-old chicks across a wide geographical range.

In total, four hundred and fifty (450) samples were collected aseptically, with each hatchery contributing ninety (90) samples. The collected samples were stratified as follows:

- chicks (n=150): Thirty (30) newly hatched chicks (less than 24 hours old) per hatchery were randomly selected. These chicks were humanely euthanized in strict accordance with the American Veterinary Medical Association (AVMA) guidelines, and their cecal contents were collected directly into sterile, pre-labeled 15 ml conical tubes;

- eggshells (n=150): From each of the hatcher trays, thirty (30) pieces of eggshells (approximately 4 cm² each) with attached membranes were collected from various positions immediately after the chicks were removed

- workers (n=150): Hand swabs were collected from thirty (30) consenting workers (six workers from each of the five hatcheries) at the end of their work shifts. Informed consent was obtained from each participant prior to swab collection. For this procedure, a standardized protocol was followed: a sterile gauze swab, pre-moistened with 5 ml of Buffered Peptone Water (BPW), was used to thoroughly swab the entire surface of the hands, including the fingers and beneath the fingernails.

Following collection, all samples were immediately placed into a cooler equipped with ice packs and were transported to the laboratory to be processed within 4 hours of collection.

Microbiological isolation and biochemical identification

Salmonella isolation and identification followed the International Organization for Standardization protocol ISO 6579-1:2017 [11] with minor adjustments. In brief, every sample was homogenized and subsequently non-selectively pre-enriched by incubation in BPW at 37 °C for 18±2 hours. Thereafter, 0.1 ml of the pre-enrichment culture was transferred to 10 ml of Rappaport-Vassiliadis (RV) broth and incubated for 24 hours at 41.5 °C. Afterward, a loopful of the RV broth was streaked onto both xylose lysine deoxycholate (XLD) agar and Hektoen enteric (HE) agar and incubated at 37 °C for 24±3 hours. Of the presumptive *Salmonella* colonies (black-centered on XLD, green with black centers on HE), the rest were purified on tryptic soy agar (TSA) for additional studies.

Systematic biochemical confirmation was performed. Characterization of purified isolates was initially conducted using conventional tubed media. Each isolate was subjected to triple sugar iron (TSI) agar in order to assess its reactions in glucose and lactose/sucrose fermentation and to evaluate hydrogen sulfide production. The lysine iron agar (LIA) was used to assess lysine decarboxylation, while urea broth was utilized to rule out urease-positive organisms, and assessment of Simmons citrate agar was performed to evaluate the ability to use citrate as the sole carbon source.

Presumptive *Salmonella* isolates would usually display TSI reactions with an alkaline (red) slant and acid (yellow) butt, with H₂S blackening, while LIA shows H₂S and a purple butt, and urea color change is absent, with variable reactions regarding citrate utilization. All remaining biochemically typical isolates were then confirmed using the API 20E system (bioMérieux, France) as per the guidelines, and the serotype VITEK 2 Compact System (bioMérieux, France) with the GN ID card.

Serological typing

All confirmed *Salmonella* isolates were serotyped at the National Reference Laboratory for Salmonella in Baghdad. Slide agglutination tests were subsequently carried out according to the White-Kauffmann-Le Minor scheme using specific somatic (O) and flagellar (H) antisera (Statens Serum Institut, Denmark) [11]. All serotyping procedures were performed by trained technicians to ensure quality assurance.

Antimicrobial susceptibility testing (AST)

Antimicrobial susceptibility testing for all confirmed *Salmonella* isolates was carried out using the disc diffusion method on Mueller-Hinton agar per CLSI recommendations. A panel of twelve antimicrobial agents representing nine classes was selected due to their relevance in human and veterinary medicine: ampicillin (AMP, 10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AMC, 20/10 µg), cefotaxime (CTX, 5 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), imipenem (IPM, 10 µg), gentamicin (CN, 10 µg), tetracycline (TE, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 1.25/23.75 µg), azithromycin (AZM, 15 µg), and chloramphenicol (C, 30 µg).

Inoculum preparation followed the 0.5 McFarland standard. Plates were incubated for 16–18 hours at 35±2 °C. Following the measurement of the zones of inhibition, the results were categorized as susceptible (S), intermediate (I), or resistant (R), in accordance with CLSI criteria. Quality control consisted of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Multidrug resistance (MDR) was defined as non-susceptibility to at least three antimicrobial classes.

Data analysis

Data were analyzed using SPSS statistical software (version 28.0, IBM Corp., USA). Prevalence was expressed alongside a 95 % confidence interval (CI). To assess differences in prevalence across sample types and hatcheries, the chi-square test or Fisher's exact test was

employed. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results and discussion

Prevalence of *Salmonella* and distribution by sample type

The comprehensive microbiological analysis confirmed the presence of *Salmonella* in 38 of the 450 collected samples, representing an overall prevalence of 8.4 % (95% CI: 6.1–11.4%), as detailed in **Table 1**. Varying prevalence rates were observed across the different sample types, with the highest isolation rate recorded in chick cecal contents at 12.0 % (18/150). This finding indicates that a significant proportion of the progeny were colonized at an early developmental stage.

Table 1

Prevalence of *Salmonella* by sample type in Iraqi broiler hatcheries

Sample type	Number tested	Number positive	Prevalence, %	95% confidence interval (CI)
Chick cecal contents	150	18	12.0	7.3–18.3
Eggshells	150	11	7.3	3.7–12.7
Worker hand swabs	150	9	6.0	2.8–11.1
Total	450	38	8.4	6.1–11.4

Furthermore, *Salmonella* was detected on 7.3% (11/150) of the evaluated eggshells, pointing toward potential vertical transmission or environmental contamination within the hatcher trays. Regarding public health implications and potential occupational exposure, the pathogen was also isolated from 6.0 % (9/150) of worker hand swabs, highlighting a critical interface for zoonotic transmission.

Definition and distribution of dominant serotypes

The 38 isolates that underwent serological characterization showed that most belonged to two major serotypes, as demonstrated in **Table 2**. *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Kentucky together comprised more than 60 % of all isolates. Other clinically and poultry-relevant serovars, including *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, and *S. Virchow*, were also recognized, albeit in much less predominant numbers.

Table 2

Serotype distribution of *Salmonella* isolates from Iraqi hatcheries

<i>Salmonella</i> serovar	Number of isolates	Percentage, %
<i>S. Enteritidis</i>	13	34.2
<i>S. Kentucky</i>	10	26.3
<i>S. Infantis</i>	5	13.2
<i>S. Typhimurium</i>	4	10.5
<i>S. Mbandaka</i>	3	7.9
<i>S. Virchow</i>	3	7.9
Total	38	100

It is important to highlight that the two dominant serotypes were not restricted to a single source but were

recovered from all three sample matrices, demonstrating their active circulation and persistence in the hatchery environment. Specifically, *S. Enteritidis* was retrieved from 6 chick ceca, 4 eggshells, and 3 worker hand swabs, whereas *S. Kentucky* was recovered from 4 chick ceca, 3 eggshells, and 3 worker hand swabs.

Antimicrobial resistance patterns and multidrug resistance

The AST results exhibited concerning antimicrobial resistance rates among the isolates, with the dominant pattern of each serotype outlining a specific profile. The descriptive resistance data are summarized in **Table 3**, indicating that the most common resistance profiles were directed against tetracycline and ampicillin.

Table 3
Antimicrobial resistance profile of all *Salmonella* isolates (n=38)

Antimicrobial agent (class)	Number of resistant isolates	Resistance, %
Tetracycline (tetracyclines)	28	73.7
Ampicillin (penicillins)	25	65.8
Trimethoprim-sulfamethoxazole (diaminopyrimidines/sulfonamides)	14	36.8
Chloramphenicol (amphenicols)	11	28.9
Amoxicillin-clavulanic acid (beta-lactam/beta-lactamase inhibitor)	8	21.1
Ciprofloxacin (fluoroquinolones)	6	15.8
Gentamicin (aminoglycosides)	5	13.2
Cefotaxime (3rd gen. cephalosporins)	4	10.5
Ceftazidime (3rd gen. cephalosporins)	3	7.9
Azithromycin (macrolides)	3	7.9
Aztreonam (monobactams)	2	5.3

Thus, the AST results demonstrate a high frequency of resistance to older, commonly used antimicrobials, particularly tetracycline and ampicillin, among the isolates. Conversely, lower resistance rates were observed against critically important antimicrobials, including third-generation cephalosporins, macrolides, and monobactams. Notably, no resistance was detected against imipenem, which indicates that carbapenems remain fully effective against all recovered *Salmonella* strains. These findings underline a concerning trend toward multi-drug resistance (MDR) within the hatchery environment, highlighting the urgent need for targeted antimicrobial stewardship in the poultry sector.

A detailed comparison of the phenotypic resistance characteristics revealed that antimicrobial resistance profiles in *S. Kentucky* were consistently higher than those observed in *S. Enteritidis*, with particularly pronounced disparities regarding tetracycline and ciprofloxacin susceptibility rates. While both serotypes demonstrated extensive resistance toward older first-line antimicrobials, the exact quantitative distribution of these resistance traits varied significantly. These comparative resistance patterns and their

respective stratification among the 23 dominant isolates are detailed in **Table 4**.

Table 4
Comparative antimicrobial resistance profiles of the dominant *Salmonella* serotypes

Antimicrobial agent	<i>S. Enteritidis</i> (n=13) resistant, %	<i>S. Kentucky</i> (n=10) resistant, %
Ampicillin (AMP)	69.2 (9)	80.0 (8)
Tetracycline (TE)	76.9 (10)	90.0 (9)
Ciprofloxacin (CIP)	7.7 (1)	40.0 (4)
Cefotaxime (CTX)	7.7 (1)	20.0 (2)
Trimethoprim-sulfa (SXT)	30.8 (4)	50.0 (5)
MDR rate	38.5 (5)	60.0 (6)

The overall MDR rate calculated for all 38 recovered isolates from the hatcheries was 39.5 % (15/38). As demonstrated in **Table 4**, *S. Kentucky* carries the highest burden of MDR within the monitored facilities, with a remarkably high proportion of isolates resistant to multiple critical drug classes.

Thus, the comparative data indicate that while *S. Enteritidis* remains a highly prevalent threat with high resistance to ampicillin (69.2 %) and tetracycline (76.9 %), it still retains relatively high susceptibility to critical fluoroquinolones and third-generation cephalosporins. Conversely, *S. Kentucky* demonstrates an alarming expansion of resistance phenotypes, exhibiting a 40.0 % resistance rate to ciprofloxacin and a 20.0 % resistance rate to cefotaxime, alongside a staggering 60.0 % multidrug resistance rate. These findings emphasize that *S. Kentucky* represents a highly resilient, dangerous vehicle for critical resistance genes within the Iraqi poultry production continuum, demanding immediate targeted surveillance.

This detailed study sheds significant light on the *Salmonella* dynamics within the Iraqi broiler hatchery system, demonstrating that the environment is dominated by two high-risk serotypes characterized by concerning levels of antimicrobial resistance.

Though the overall prevalence of 8.4 % is moderate, it carries substantial epidemiological significance, as it confirms that the hatchery environment acts as a critical *Salmonella* reservoir and a primary dissemination node at the very beginning of the production chain. The 12.0 % prevalence observed in chick ceca serves as a clear indicator of successful vertical transmission from breeder flocks and immediate post-hatch colonization, which represents a primary determinant for persistent bacterial shedding and downstream contamination [13, 14].

Furthermore, the detection of *Salmonella* in 6.0 % of worker hand swabs constitutes a major public health finding. This result quantifies the direct occupational hazard and aligns with global studies describing poultry workers as a high-risk population for exposure to enteric pathogens [15]. These findings emphasize an urgent need for targeted biosecurity education, particularly within Iraqi facilities where stringent hygiene practices are most critical, necessitating

the enforcement of strict handwashing protocols and the mandatory use of personal protective equipment, such as gloves.

The most notable outcome of this investigation is the clear predominance of two specific serotypes: *Salmonella* Enteritidis (34.2 %) and *Salmonella* Kentucky (26.3 %). The prevalence of *S. Enteritidis* is particularly concerning, as this serotype remains the leading cause of egg-associated salmonellosis globally [9, 16]. It poses a unique threat due to its specific capacity to colonize the avian reproductive tract, specifically the oviduct, thereby contaminating the internal contents of intact eggs via vertical transmission.

Its persistent presence during hatchery operations indicates active circulation within the breeder flocks supplying the hatching eggs. Moreover, the concurrent detection of *S. Enteritidis* on eggshells and worker hands illustrates the ease with which the pathogen disseminates within the hatchery facility, highlighting multiple interconnected routes for potential occupational and environmental exposure.

The widespread incidence of *S. Kentucky* suggests another serious issue, highlighting a substantial epidemiological challenge. This serotype is highly adaptive, successful, and environmentally resilient. Furthermore, *S. Kentucky* is frequently characterized by multidrug resistance [10, 17]. In our study, the resistance profile of *S. Kentucky* is highly concerning, particularly the 40.0 % resistance rate to ciprofloxacin. Ciprofloxacin is a fluoroquinolone that is critically important to human medicine. In humans, infections caused by resistant *Salmonella* strains are more likely to be severely invasive and exhibit a poor response to standard treatments [18]. Consequently, the high multidrug resistance rate (60.0%) found among the *S. Kentucky* isolates severely limits therapeutic options in both human and veterinary medicine.

The high background level of antimicrobial resistance, especially to tetracycline and ampicillin, is indicative of the prolonged and often unregulated use of these antibiotics for growth promotion and disease prevention in the Iraqi poultry industry, as documented in previous studies [5, 19]. This widespread usage creates a powerful selective pressure that favors the emergence and persistence of the multidrug-resistant strains of *S. Kentucky* identified in this research. Within the hatcheries, the high chick densities and potential biosecurity lapses further facilitate the horizontal dissemination of these resilient clones [20].

In conclusion, the hatchery environment in Iraq does not represent a random, unorganized collection of *Salmonella*. Instead, it is dominated by two highly specialized, high-risk strains: *S. Enteritidis*, acting as the classic egg-borne threat, and multidrug-resistant *S. Kentucky*, representing a modern antimicrobial-resistant threat. The co-existence of these two strains severely jeopardizes food safety and public health. Consequently, *S. Enteritidis* will require compartmentalized monitoring and control within breeder flocks. Conversely, *S. Kentucky* will necessitate enhanced environmental sanitation, robust biosecurity measures to rupture the contamination cycle, and significant

restrictions on the use of critical antimicrobials, such as fluoroquinolones.

This is the first study to present commercial broiler hatcheries in Iraq as reservoirs of multidrug-resistant *Salmonella*, predominantly *S. Enteritidis* and *S. Kentucky*. The contamination of workers' hands with these pathogens poses a distinct occupational and zoonotic risk. However, this contamination also presents a strategic opportunity to intervene in the poultry production chain. Addressing these challenges effectively will require an integrated and proactive One Health approach.

To manage the major risks outlined in this study, the adoption of a comprehensive risk mitigation framework is essential. This process must start with the implementation of measures to strengthen biosecurity, maintained through regular auditing of breeding farms and hatcheries to avoid the initial introduction and subsequent spread of *Salmonella*. In the same vein, the introduction of antimicrobial stewardship at the national level must be prioritized, particularly regarding the control of non-therapeutic use of critically important antibiotics, such as fluoroquinolones, to reduce the selective pressure associated with the escalation of multidrug-resistant strains.

Additionally, the risk associated with direct zoonotic transmission calls for the introduction of occupational health and safety programs to ensure and monitor the compliance of hatchery personnel with the use of personal protective equipment and the adoption of effective hand hygiene. Lastly, the implementation of a national system for active surveillance, which entails *Salmonella* serotype and antimicrobial resistance pattern profiling within hatcheries, will guide these actions and assess their long-term impact. The rationale for this framework is the precise management of rapidly changing public health and veterinary challenges, which is a direct function of an active surveillance system. Ultimately, to safeguard the Iraqi poultry sector, and by extension the human population, from the risks of salmonellosis and antimicrobial resistance, it is vital to respond to these challenges directly at the hatchery level.

Conclusions

This study demonstrates that commercial broiler hatcheries in Iraq serve as critical reservoirs for *Salmonella*, with an overall isolation prevalence of 8.4 % (38/450). The contamination burden was heavily driven by two dominant high-risk serotypes, namely *Salmonella* Enteritidis (34.2 %) and multidrug-resistant *Salmonella* Kentucky (26.3 %). Alarming, the highest colonization rate was recorded in chick cecal contents at 12.0 %, while environmental and occupational transmission routes were confirmed via contaminated eggshells (7.3 %) and worker hand swabs (6.0 %). The recovered isolates exhibited extensive phenotypic resistance to older first-line antimicrobials, particularly tetracycline (73.7 %) and ampicillin (65.8 %). Furthermore, *Salmonella* Kentucky displayed a concerning 40.0 % resistance rate to ciprofloxacin, which is critically important for human medicine. With an overall multidrug resistance rate of

39.5 % that escalates to 60.0 % specifically in *Salmonella* Kentucky clones, these findings highlight an urgent need for national One Health surveillance and strict antimicrobial stewardship at the hatchery level.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The author declares that the conducted studies fully comply with generally accepted norms of humane treatment of animals, the principles of bioethics, and the ethical principles of the Declaration of Helsinki for human-related research.

This study was officially approved by the Scientific Ethical Committee of the College of Veterinary Medicine, University of Diyala, Iraq (Approval No: Vet Medicine (222); November 2025, b, A and A).

To minimize animal stress and discomfort, all handling, maintenance, and experimental sampling procedures involving day-old chicks were performed in strict accordance with standard veterinary guidelines, current international principles of animal welfare, and recommendations outlined by the American Veterinary Medical Association (AVMA).

For the human infrastructure segment involving hatchery personnel, formal institutional ethical clearance for hand swab collection was obtained prior to the commencement of the study. Written or verbal informed consent was explicitly obtained from the participating hatchery workers before any swab collection was performed, and all participants were fully informed about the specific purpose of the study and the strict confidentiality of their data.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The author states that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The author expresses sincere gratitude to the Environment and Water Department of the Ministry of Science and Technology for providing the necessary support and facilities to conduct this research.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The author declares that no generative AI or AI-assisted technologies were used during the preparation, writing, translation, or language polishing of this manuscript. The final content was fully authored and reviewed by the researcher, who takes sole responsibility for the work.

References

- Kirk, M. D., Pires, S. M., Black, R. E., Caipo, M., Crump, J. A., Devleesschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C. L., Hald, T., Hall, A. J., Keddy, K. H., Lake, R. J., Lanata, C. F., Torgerson, P. R., Havelaar, A. H., & Angulo, F. J. (2015). World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. *PLOS Medicine*, 12(12), e1001921. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., & Devleesschauwer, B. (2015). World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS Medicine*, 12(12), e1001923. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P. I., & Weill, F.-X. (2014). Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165(7), 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>
- Samad, A., Hamza, M., Muazzam, A., Ahmer, A., Tariq, S., Shahid, M. J., Din, F. U., Akram, W., Kaleem, M. Z., & Ahmad, S. (2022). Overview of bacterial diseases in poultry and policies to control disease and antibiotic resistance. *BULLET: Jurnal Multidisiplin Ilmu*, 1(1), 1–5.
- Almashadany, D. A., Hassan, A. A., & Khan, I. U. H. (2025). Prevalence, serotypes, and antimicrobial resistance of *Salmonella* species in ready-to-eat foods in Erbil, Iraq. *Microorganisms*, 13(10), 2225. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13102225>
- Kanaan, M. H. G. (2023). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from retail chicken meat in Wasit markets, Iraq. *Veterinary World*, 455–463. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.455-463>
- Shafee, A., & Abdulwahid, M. (2024). Occurrence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Salmonella enterica* from chicken products and human in Wasit Governorate of Iraq. *Open Veterinary Journal*, 14(5), 1117. <https://doi.org/10.5455/ovj.2024.v14.i5.5>
- Ali, N., Abdulrahman, N., Aziz, S., & Hassan, S. (2023). Pathological and molecular investigation of paratyphoid *Salmonella* infection in broiler chicks in Sulaymaniyah province, Kurdistan/Iraq. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 22(3), 42–56. <https://doi.org/10.23975/bjvetr.2023.142197.1036>
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., & Van Immerseel, F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 718–738. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x>
- Şik, Z., & Akan, M. (2024). Determination of antibiotic resistance in *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky serotypes of animal origin using conventional and molecular methods. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 48(1), 72–81. <https://doi.org/10.55730/1300-0128.4338>
- International Organization for Standardization. (2017). *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella – Part 1: Detection of Salmonella spp.* (ISO Standard No. 6579-1:2017). <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:6579:-1:ed-1:vl:en>
- Grimont, P. A. D., & Weill, F.-X. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars* (9th ed.). WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella; Institut Pasteur.
- Cox, N. A., Bailey, J. S., Mauldin, J. M., & Blankenship, L. C. (1990). Research note: presence and impact of *Salmonella* contamination in commercial broiler hatcheries. *Poultry Science*, 69(9), 1606–1609. <https://doi.org/10.3382/ps.0691606>
- Abdel-Maksoud, M., Abdel-Khalek, R., El-Gendy, A., Gamal, R. F., Abdelhady, H. M., & House, B. L. (2015). Genetic characterisation of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotypes isolated from poultry in Cairo, Egypt. *African Journal of Laboratory Medicine*, 4(1). <https://doi.org/10.4102/ajlm.v4i1.158>
- Price, L. B., Graham, J. P., Lackey, L. G., Roess, A., Vailas, R., & Silbergeld, E. (2007). Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. poultry workers. *Environmental Health Perspectives*, 115(12), 1738–1742. <https://doi.org/10.1289/ehp.10191>
- Whiley, H., & Ross, K. (2015). *Salmonella* and eggs: from production to plate. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(3), 2543–2556. <https://doi.org/10.3390/ijerph120302543>

17. Le Hello, S., Bekhit, A., Granier, S. A., Barua, H., Beutlich, J., Zając, M., Münch, S., Sintchenko, V., Bouchrif, B., Fashae, K., Pinsard, J.-L., Sontag, L., Fabre, L., Garnier, M., Guibert, V., Howard, P., Hendriksen, R. S., Christensen, J. P., Biswas, P. K., Cloeckaert, A., Rabsch, W., Wasyl, D., Doublet, B., & Weill, F.-X. (2013). The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain. *Frontiers in Microbiology*, 4, 395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00395>
18. Borges, K., Furian, T., Souza, S., Salle, C., Moraes, H., & Nascimento, V. (2019). Antimicrobial resistance and molecular characterization of salmonella Enterica serotypes isolated from poultry sources in Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21(1). <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0827>
19. Ziech, R. E., Lampugnani, C., Perin, A. P., Sereno, M. J., Sfaciotte, R. A. P., Viana, C., Soares, V. M., de Almeida Nogueira Pinto, J. P., & dos Santos Bersot, L. (2016). Multidrug resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.021>
20. Xiong, Z., Wang, S., Huang, Y., Gao, Y., Shen, H., Chen, Z., Bai, J., Zhan, Z., Wen, J., Liao, M., & Zhang, J. (2020). Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky ST198 in broiler chicken supply chain and patients, China, 2010–2016. *Microorganisms*, 8(1), 140. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010140>

ORCID

H. I. Ali 

<https://orcid.org/0000-0002-4314-4173>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Assessment of Brovitacoccid efficacy against *Eimeria* spp. in naturally infected broiler chickens

D. Feshchenko¹ | Yu. Dovhiy¹ | A. Berezovskyi² | O. Zghozinska¹

Article info

Correspondence Author
D. Feshchenko
E-mail:
dollyfdv83@gmail.com¹ Polissia National University,
Staryi Blvd., 7,
Zhytomyr, 10008, Ukraine² Brovapharma LLC,
Nezalezhnosti Blvd, 18a,
Brovary, Kyiv region, 07400,
Ukraine**Citation:** Feshchenko, D., Dovhiy, Yu., Berezovskyi, A., & Zghozinska, O. (2026). Assessment of Brovitacoccid efficacy against *Eimeria* spp. in naturally infected broiler chickens. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 102–108. doi: 10.31210/spi2026.29.02.15

Chicken coccidiosis remains one of the most prevalent and economically significant parasitic diseases in industrial poultry production, linked to impaired productivity, metabolic disturbances, intestinal damage, and substantial economic losses. This study provides a comprehensive evaluation of the efficacy of the veterinary medicinal product “Brovitacoccid” (Brovafarma LLC) in broiler chickens naturally infected with *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, and *Eimeria maxima*. The aim was to determine the anticoccidial efficacy of this product based on clinical, parasitological, pathological, haematological, and biochemical parameters, and to justify its use for the prevention and treatment of chicken coccidiosis. The investigation was conducted in 2025 on 48 broiler chickens aged 14–16 days, naturally infected with *Eimeria* spp., under the production conditions of “U Farming Group” LLC (Zhytomyr region, Ukraine). The disease was characterised by pronounced clinical signs, anaemia, disturbances in protein metabolism, and severe pathological lesions in the intestine. Administration of the product at a dosage of 2 g/L of drinking water for seven consecutive days resulted in a statistically significant reduction in infection intensity: by day 14, the oocyst count had decreased to 7.3 ± 0.9 thousand/g of faeces, and by day 28, the reduction in oocyst shedding reached 83.8 % compared to the control group. The prevalence of infection in the treated group dropped to 4.3 %, whereas it remained high in untreated birds. Treatment with “Brovitacoccid” was associated with marked clinical improvement, including reduced diarrhoea, enhanced appetite, and increased activity of the birds. The treated group showed lower mortality (4.2 % vs. 20.8 % in the control group), higher flock survival (95.8 % vs. 79.2 %), and significantly higher body weight gain. Hematological and biochemical analyses revealed a marked normalization of parameters on day 28 of the experiment: red blood cell count ($2.7 \pm 0.15 \times 10^{12}/L$, $p < 0.05$), white blood cell count ($19.3 \pm 0.9 \times 10^9/L$, $p < 0.05$), hemoglobin content (106.2 ± 3.1 g/L, $p < 0.05$), total protein level (38.4 ± 1.1 g/L, $p < 0.05$), and alkaline phosphatase activity (135.6 ± 8.4 U/L, $p < 0.05$). These findings indicate restoration of homeostasis and attenuation of the inflammatory response. Pathological examination confirmed less severe intestinal lesions in treated chickens. These findings demonstrate the high therapeutic and prophylactic efficacy of “Brovitacoccid”, confirm its safety for poultry, and support its use in industrial poultry farming and support its use in industrial poultry farming, offering a cost-effective strategy for coccidiosis control.

Keywords: *Eimeria*, Amprolium hydrochloride, anemia, treatment, effectiveness, chickens.

Оцінка ефективності Бровітакокциду проти *Eimeria* spp. у природно інвазованих курчат-бройлерів

Д. В. Фещенко¹ | Ю. Ю. Довгій¹ | А. В. Березовський² | О. А. Згозінська¹¹ Поліський
Національний університет,
м. Житомир, Україна² ТОВ «БРОВАФАРМА»,
м. Бровари, Україна

Еймеріоз курей залишається однією з найбільш поширених і економічно значущих паразитарних хвороб у промисловому птицеводстві, що супроводжується зниженням продуктивності, порушенням обміну речовин, ураженням кишечника та значними економічними втратами. У статті наведено результати комплексної оцінки ефективності препарату ТОВ «Бровафарма» «Бровітакокцид» за еймеріозу курчат-бройлерів, спричиненого *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* та *Eimeria maxima*. Метою дослідження було визначення антикоксидійної ефективності препарату за клінічними, паразитологічними, патологоанатомічними, гематологічними та біохімічними показниками, а також обґрунтування його застосування для профілактики та лікування еймеріозу курей. Дослідження проведено у 2025 році на 48 курчат-бройлерів віком 14–16 днів, спонтанно інвазованих еймеріями, в умовах ТОВ «Ю Фармінг Груп» (Житомирська область). Встановлено, що захворювання супроводжувалося вираженими клінічними ознаками, розвитком анемії, порушеннями білкового обміну та значними патологоанатомічними ураженнями кишечника. Застосування препарату у дозі 2 г/л води протягом 7 днів сприяло достовірному зниженню інтенсивності інвазії: на 14-ту добу кількість ооцист становила $7,3 \pm 0,9$ тис./г посліду, а на 28-му добу редукція ооцистовиділення досягала 83,8 % порівняно з контролем. Екстенсивність інвазії у дослідній групі знизилася до 4,3 %, тоді як у контрольній залишалася високою. Застосування препарату супроводжувалося покращенням клінічного стану птиці, зменшенням проявів діареї, підвищенням апетиту та активності. У дослідній групі відзначали нижчу летальність (4,2 % проти 20,8 % у контролі), вищу збереженість поголів'я (95,8 % проти 79,2 %), а також кращі показники приросту маси тіла. Гематологічні та біохімічні дослідження засвідчили виражену нормалізацію показників на 28 добу експерименту: кількості еритроцитів ($2,7 \pm 0,15 \times 10^{12}/л$, $p < 0,05$) і лейкоцитів ($19,3 \pm 0,9 \times 10^9/л$, $p < 0,05$), вмісту гемоглобіну ($106,2 \pm 3,1$ г/л, $p < 0,05$), рівня загального протеїну ($38,4 \pm 1,1$ г/л, $p < 0,05$) та активності лужної фосфатази ($135,6 \pm 8,4$ Од/л, $p < 0,05$), що свідчить про відновлення гомеостазу та зниження запальної реакції. Патологоанатомічно встановлено менш виражені ураження кишечника у курчат дослідної групи. Отримані результати свідчать про високу терапевтичну та профілактичну ефективність препарату «Бровітакокцид», його безпечність для птиці та доцільність застосування у промисловому птицеводстві, що забезпечує економічно ефективну стратегію контролю кокцидіозу.

Ключові слова: *Eimeria*, ампроліуму гідрохлорид, анемія, лікування, ефективність, курчата.

Бібліографічний опис для цитування: Фещенко Д. В., Довгій Ю. Ю., Березовський А. В., Згозінська О. А. Оцінка ефективності Бровітакокциду проти *Eimeria* spp. у природно інвазованих курчат-бройлерів. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 102–108.

Вступ

У сучасному птахівництві, зокрема у вирощуванні свійської птиці, надзвичайно актуальним залишається питання ефективної та безпечної профілактики еймеріозу – однієї з найбільш поширених інвазійних хвороб птахів, що уражає кишківник молодняка [7, 15, 16, 19].

Протягом останніх десятиліть світова ветеринарна наука приділяє значну увагу проблемі еймеріозів домашньої птиці. У країнах з розвиненим птахівництвом (США, Франція, Бразилія, Нідерланди, Китай) щорічно витрачаються мільйони доларів на профілактику, лікування та генетичну селекцію птиці, стійкої до еймерій [3, 5, 12, 17]. Зокрема, у США ще з 1950-х років активно використовувались сульфаніламідні препарати, а згодом було впроваджено іонофорні кокцидіостатики. Однак вже у 1990-х роках відзначено зниження їх ефективності через розвиток стійких штамів еймерій [3].

Серед основних проблем боротьби з еймеріями: швидка адаптація збудників до традиційних кокцидіостатиків; токсичність багатьох препаратів для ослаблених або молодих птахів; порушення формування імунної відповіді при тривалому застосуванні деяких антикокцидійних засобів [1, 4, 14].

У країнах Європейського Союзу останнім часом спостерігається тенденція до зниження використання хімічних кокцидіостатиків та переходу до природних або міксованих препаратів з вітамінною підтримкою, які сприяють формуванню імунітету без пригнічення росту молодняка [6, 9, 13, 20]. Науковці наголошують на важливості розробки препаратів, які діють вибірково на паразита, водночас зберігаючи функціональність кишкової мікрофлори та імункомпетентність птиці [21]. Саме до таких засобів належить вітчизняний препарат Бровітакокцид, що вписується у світову концепцію «м'якої» боротьби з еймеріозом – зі збереженням довготривалої ефективності та безпечності.

Бровітакокцид, що містить ампроліуму гідрохлорид у поєднанні з вітамінами А та К₃, вирізняється низькою токсичністю, селективною дією та сумісністю з кормовими компонентами. Препарат не проникає у тканини птиці, а діє локально в кишківнику, не викликаючи системних побічних ефектів, що робить його особливо привабливим для використання в декоративному птахівництві, де вимоги до безпеки препаратів максимально високі [2, 10, 11, 18].

Враховуючи потребу у розробці видоспецифічних протоколів застосування Бровітакокциду, дана тема є науково обґрунтованою та практично значущою. Отримані результати можуть бути впроваджені у ветеринарну практику з метою підвищення біобезпеки сучасного птахівництва.

Мета дослідження

Мета роботи – провести експериментальне обґрунтування антикокцидійної ефективності препарату «Бровітакокцид» (виробництво ТОВ «БРОВАФАРМА») проти деяких еймерій видів –

Eimeria acervulina, *E. maxima* та *E. tenella* (для лікування хворих курей, профілактики ураження і проведення оздоровчих заходів).

Матеріали і методи

Умови проведення досліджень та формування груп птиці

Клінічні випробування були проведені у 2025 році на базі товариства з обмеженою відповідальністю «Ю Фармінг Груп» (Житомирська область, Оліївська територіальна громада), спеціалізація – розведення бройлерів. Дослідження проводили на 48 курчат-бройлерів віком від чотирнадцяти до шістнадцяти діб, спонтанно уражених еймеріями. Птахів розділили на дві групи, по 24 голови в кожній: дослідну та контрольну. Курчат утримували в ізольованих кліткових секціях із підстилкою на підлозі, що повністю виключало контакт із загальним поголів'ям підприємства. Раціон забезпечували повнораціонним комбікормом, збалансованим за білками, амінокислотами, вітамінами та мінералами відповідно до вікових потреб бройлерів.

Схема експерименту та застосування препарату

Загальний протокол дослідження був організований за такою послідовною схемою:

1. Збір анамнестичних даних, клінічний огляд, зважування та формування груп.
2. Відбір зразків посліду для виявлення та видового визначення еймерій.
3. Через 24 години після підтвердження діагнозу курчатам дослідної групи задавали препарат Бровітакокцид (виробництво ТОВ «БРОВАФАРМА») у дозі 2 г/л питної води протягом 7 діб відповідно до інструкції із застосування. Птахам контрольної групи лікування не проводили, вони утримувалися без застосування протикокцидійних засобів.
4. Клінічне спостереження, моніторинг споживання корму та води, а також облік падежу проводили щоденно до 28-ми добового віку птиці.
5. Контроль ефективності лікування здійснювали на 7-й, 14-й, 21-й та 28-й день шляхом повторного відбору та дослідження посліду (по 15 проб на групу) для підрахунку кількості ооцист.

Клінічну ефективність препарату оцінювали за динамікою клінічних симптомів, середньодобовим приростом маси тіла, збереженістю поголів'я, показником загибелі (летальності), інтенсивністю інвазії та ступенем ураження кишечника при некропсії.

Паразитологічні методи досліджень

Паразитологічні дослідження здійснювали таким чином: відбір зразків посліду у курчат проводили методом Фюллеборна. Попередньо зразки піддавали споруляції у лабораторному термостаті при температурі 18–22 °C протягом 72 годин для забезпечення можливості точної ідентифікації еймерій за видовими ознаками.

Кількісну оцінку ступеня інвазії проводили за допомогою камери Мак-Мастера згідно з класичною методикою визначення концентрації ооцист у посліді.

Проби розбавляли насиченим сольовим розчином у відповідній пропорції, після чого здійснювали підрахунок ооцист у визначеному об'ємі зразка під мікроскопом KERN OBE (KERN, Німеччина). Розрахунок інтенсивності інвазії (ооцист на один грам посліду) проводили з урахуванням кратності розведення та маси досліджуваного зразка за формулою:

$$I = (K \times D) / m$$

де: K – кількість ооцист, підрахованих у камері Мак-Мастера;

D – коефіцієнт розведення зразка;

m – маса досліджуваного зразка посліду (г).

Результати підрахунку інтенсивності інвазії подавалися у тисячах ооцист на 1 г посліду (тис. ооцист/г). Ефективність лікування визначали за показниками екстенсивності (частка птахів, у яких не виявлено ооцист після лікування, у відсотках) та редукції ооцистовиділення (зниження чисельності ооцист порівняно з контрольною групою, у відсотках).

Гематологічні та біохімічні методи досліджень

Морфологічні показники крові, що включали визначення кількості еритроцитів та лейкоцитів із використанням камери Горяєва, а також концентрацію гемоглобіну гемоглобінціанідним методом, досліджували на сьомий та чотирнадцятий день після початку лікування. Кров відбирали у 7 курчат із кожної групи з підкрильцевої вени вранці, до годівлі, з використанням тонкої голки (27G).

Біохімічні дослідження сироватки крові, які включали визначення вмісту загального протеїну, альбумінів, загального білірубину та активності лужної фосфатази, проводили за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатора Chem 7 (Erba Mannheim, Індія). Прилад використовували для визначення основних біохімічних показників методом фотометричного аналізу відповідно до затверджених методичних рекомендацій та інструкцій виробника.

Патоморфологічні дослідження

Для встановлення ступеня ураження органів травного каналу та оцінки профілактично-лікувальної ефективності препарату Бровітакокцид проводили патологоанатомічний розтин (некропсію) виключно тієї птиці, яка загинула природним шляхом у ході експерименту. Патологоанатомічні зміни в кишечнику загинувших курчат оцінювали візуально шляхом макроскопічного дослідження стану слизової оболонки, наявності геморагічних уражень, фібринозних нашарувань і тифліту. Кількісну оцінку макроскопічних змін здійснювали за допомогою розрахунку загального індексу ураження кишечника, який визначали за класичною чотирибальною шкалою від 0 до 4 балів.

Оцінка безпечності та статистичний аналіз

Для виявлення можливих побічних реакцій спостерігали за поведінкою, апетитом, руховою активністю та координацією птахів упродовж 24–48 годин після першого введення препарату.

Для порівняння середніх значень між двома групами використовували t -тест для незалежних вибірок. Усі статистичні розрахунки виконували за допомогою пакету SPSS Statistics 23.0 (IBM Corporation). Достовірність різниць визначалася за рівнем значущості $p < 0,05$. Результати наведено у вигляді $M \pm SD$, де M – середнє арифметичне, SD – середньоквадратичне відхилення.

Результати та їх обговорення

Від хворих курчат дослідного господарства було виділено кокцидії трьох видів: *Eimeria tenella*, *E. acervulina* та *E. maxima*. На момент початку дослідів (16-денний вік птахів) в обох групах відзначалася висока екстенсивність інвазії (100 %) при інтенсивності виділення ооцист $17,5 \pm 1,0$ тис. та $17,3 \pm 0,9$ тис. ооцист/г у дослідній та контрольній групах відповідно (табл. 1).

Таблиця 1

Динаміка зараженості курчат-бройлерів еймеріями та ефективність Бровітакокциду

Групи птиці	Екстенсивність інвазії, %	Інтенсивність інвазії, тис. ооцист / 1 г посліду, $M \pm m$	ЕЕ Бровітакокциду, %	Редукція ооцисто-виділення, %
0-ва доба експерименту				
Дослід (n=24)	100	$17,5 \pm 1,0$	-	-
Інтактний контроль (n=24)	100	$17,3 \pm 0,9$	-	-
7-ма доба експерименту				
Дослід (n=23)	91,3	$12,8 \pm 0,8$	8,7	32,3
Інтактний контроль (n=21)	100	$18,9 \pm 1,1$	-	-
14-та доба експерименту				
Дослід (n=23)	8,7	$7,3 \pm 0,9$	91,3	66,9
Інтактний контроль (n=19)	100	$22,1 \pm 0,5$	-	-
21-ша доба експерименту				
Дослід (n=23)	8,7	$6,6 \pm 0,7$	90,3	64,1
Інтактний контроль (n=19)	89,5	$18,4 \pm 1,2$	-	-
28-ма доба експерименту				
Дослід (n=23)	4,3	$4,8 \pm 0,9$	94,9	83,8
Інтактний контроль (n=19)	84,2	$29,7 \pm 1,4$	-	-

Примітка: відбір проб посліду проводили у 15 випадково відібраних особин з кожної групи. Різниця між групами на 14-ту, 21-шу та 28-му добу є статистично достовірною ($p < 0,05$).

Після 7 діб застосування препарату Бровітакокцид у профілактично-лікувальній дозі (2 г/л питної води)

у птиці дослідної групи спостерігалася зниження інтенсивності інвазії на 32,3 % (до $12,8 \pm 0,8$ тис.

ооцист/г) при зменшенні екстенсивності до 90 %. У контрольній групі без лікування, навпаки, інтенсивність інвазії зросла до $18,9 \pm 1,1$ тис. ооцист/г, що свідчить про закономірний розвиток еймеріозу.

На 14-ту добу експерименту у дослідній групі ІІ знизилася до $7,3 \pm 0,9$ тис. ооцист/г, а екстенсивність інвазії зменшилася до 8,7 %, тоді як у контролі ці показники становили $22,1 \pm 0,5$ тис. ооцист/г та 100 % відповідно. Аналогічна динаміка зберігалася й надалі: на 21-шу добу редукція ооцистовиділення у дослідній групі сягнула 64,1 %, а на 28-му добу – 83,8 % порівняно з контролем.

Таким чином, застосування Бровітакокциду забезпечило ефективне пригнічення репродукції еймерій, про що свідчить як зниження інтенсивності ооцистовиділення, так і значне скорочення кількості інвазованих особин. Отримані результати узгоджуються з літературними даними щодо ефективності хімічних кокцидіостатиків при змішаній еймеріозній інвазії у бройлерів [8, 14].

Клінічні та зоотехнічні показники. У курчат контрольної групи з 16-ї доби відзначалися клінічні ознаки еймеріозу: апатія, анорексія, скуйовджене пір'я, діарея, часом з домішками крові. Загальна летальність у цій групі становила 20,8 % (5 з 24 птахів), тоді як у дослідній групі – лише 4,1 % (1 особина), що підтверджує захисну дію препарату (**табл. 2**).

Таблиця 2

Показники виживаності поголів'я курчат-бройлерів при застосуванні Бровітакокциду

Показник	Контроль	Дослід
Збереженість поголів'я, %	79,2	95,8
Летальність, %	20,8	4,2

Оцінка загального стану птиці показала, що вже на третю добу після початку обробки клінічні ознаки еймеріозу у бройлерів дослідної групи помітно слабшали: знижувалася частота поносу, покращувалася апетит, птиця проявляла більшу рухливість. У контрольній групі хвороба прогресувала: фіксувалися пригніченість, скуйовджене пір'я, анемічність гребеня, а в частини курчат – домішки крові в посліді.

Початкова середня маса тіла курчат на 16-й день експерименту становила $440 \pm 10,5$ г у дослідній групі та $430 \pm 9,8$ г у контрольній, що не відрізнялася статистично ($p > 0,05$) (**табл. 3**).

Таблиця 3

Динаміка маси тіла курчат-бройлерів у дослідній та контрольній групах, $n=24$

Доба експерименту	Поголів'я (дослід / контроль)	Маса тіла (г, $M \pm m$)	
		дослід	контроль
0-ва (старт)	24 / 24	$440 \pm 10,5$	$430 \pm 9,8$
21-ша	23 / 19	$533 \pm 11,3$ *	$491 \pm 10,5$
28-ма (фініш)	23 / 19	$670 \pm 13,8$ *	$570 \pm 12,2$

Примітка: достовірна різниця між групами ($p < 0,05$).

Протягом наступних 12 днів відзначалося значне зростання маси у обох групах, однак середньодобовий приріст у дослідній групі ($18,6 \pm 1,1$ г/день) був достовірно вищим ($p < 0,05$), ніж у контрольній ($12,4 \pm 0,8$ г/день). На 21-й день маса тіла дослідних птахів досягла $533 \pm 11,3$ г, у контрольній – $491 \pm 10,5$ г ($p < 0,05$).

До 28-го дня середня маса тіла дослідної групи збільшилась до $670 \pm 13,8$ г, що було статистично значущо вище, ніж у контрольній групі – $570 \pm 12,2$ г ($p < 0,05$). Водночас загальна збереженість птиці до кінця експерименту становила 95,8 % у дослідній групі та лише 79,2 % у контрольній, що свідчить про захисну дію препарату Бровітакокцид. Також це вказує на позитивний вплив препарату не лише на клінічний стан, а й на темпи росту бройлерів, що має важливе господарське значення.

Отримані дані узгоджуються з наявними літературними джерелами, в яких підкреслюється ефективність препаратів на основі ампроліуму проти еймерій птиці [8, 14]. Водночас ефективність лікування значною мірою залежить від ранньої діагностики, своєчасного початку терапії та якості застосування препарату, що було дотримано у цьому дослідженні.

Патологоанатомічні зміни.

При розтині загинувших птахів контрольної групи виявляли типові для *Eimeria tenella* ураження: геморагічне запалення сліпих кишок, фібринозні нашарування у тонкому кишечнику, петехії та слизові пробки. У дослідній групі ці патологічні прояви були поодинокими та незначними за площею.

Загальний індекс ураження кишечника, оцінений за 4-бальною макроскопічною шкалою, у контрольній групі становив $3,6 \pm 0,3$ бала, тоді як у дослідній – $1,5 \pm 0,2$ бала, що свідчить про значне зниження тяжкості уражень у 2,4 раза ($p < 0,05$).

Отримані результати підтверджують ефективність Бровітакокциду у пригніченні репродукції еймерій та покращенні клінічного стану птиці, що узгоджується з даними літератури [8, 14].

Гематологічні та біохімічні показники.

На початковому етапі експерименту, до 14-ї доби, у курчат обох груп спостерігалися подібні показники гематологічного та біохімічного профілю, що свідчить про однаковий фізіологічний стан на старті дослідження. Зокрема, концентрація гемоглобіну, рівень еритроцитів та лейкоцитів не відрізнялися статистично значущо ($p > 0,05$), що підтверджує однорідність вибірок (**табл. 4**).

Проте вже на 7-му і особливо на 14-му дні в контрольній групі почали проявлятися характерні для еймеріозу зміни: значне зниження концентрації гемоглобіну та еритроцитів ($p < 0,05$), лейкоцитоз ($p < 0,05$), а також підвищення активності лужної фосфатази, що свідчить про розвиток запального процесу і порушення обміну речовин. Ці зміни підтверджують прогресування інвазії та негативний вплив кокцидіозу на організм птиці.

Таблиця 4

Динаміка гематологічних і біохімічних показників крові курчат-бройлерів ($M \pm m$, $n=7$)

Показник	Група	0-й день	7-й день	14-й день
Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	Контрольна	2,6 $\pm$ 0,14	2,0 $\pm$ 0,13*	1,9 $\pm$ 0,12*
	Дослідна	2,4 $\pm$ 0,12	2,5 $\pm$ 0,14	2,6 $\pm$ 0,15
Гемоглобін, г/л	Контрольна	95,0 $\pm$ 2,8	90,2 $\pm$ 2,7	86,5 $\pm$ 2,3*
	Дослідна	100,5 $\pm$ 3,0	102,1 $\pm$ 2,9	103,4 $\pm$ 3,1
Лейкоцити, $\times 10^9/л$	Контрольна	22,5 $\pm$ 1,0	25,1 $\pm$ 1,0*	28,6 $\pm$ 1,1*
	Дослідна	20,5 $\pm$ 0,9	21,3 $\pm$ 0,9	22,1 $\pm$ 1,0
Загальний протеїн, г/л	Контрольна	34,2 $\pm$ 1,2	31,4 $\pm$ 1,3*	29,8 $\pm$ 1,3*
	Дослідна	36,2 $\pm$ 1,2	35,8 $\pm$ 1,2	38,4 $\pm$ 1,1
Альбуміни, г/л	Контрольна	16,0 $\pm$ 0,7	13,2 $\pm$ 0,6*	11,5 $\pm$ 0,6*
	Дослідна	16,8 $\pm$ 0,6	16,5 $\pm$ 0,7	18,1 $\pm$ 0,7
Білірубін загальний, мкмоль/л	Контрольна	5,5 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,5*	6,8 $\pm$ 0,5*
	Дослідна	4,5 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,3
Лужна фосфатаза, Од/л	Контрольна	165,2 $\pm$ 9,4	172,4 $\pm$ 10,1	185,6 $\pm$ 11,8
	Дослідна	160,7 $\pm$ 8,9	140,3 $\pm$ 9,25*	135,2 $\pm$ 7,9*

Примітка: * статистично достовірна відмінність порівняно з групою контролю, $p < 0,05$.

Натомість у дослідній групі, де застосовували Бровітакокцид, показники крові залишалися у межах фізіологічної норми, що свідчить про ефективність препарату у профілактиці та контролі еймеріозної інвазії, зменшенні запального фону і збереженні гомеостазу організму.

Для оцінки загального стану організму та реакції на лікування проводили детальний аналіз основних морфологічних і біохімічних показників крові у курчат на 28-му добу експерименту (табл. 5).

Таблиця 5

Гематологічні та біохімічні показники крові курчат на 28-му добу ($M \pm m$, $n=7$)

Показник	Контрольна	Дослідна
Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	1,8 $\pm$ 0,12	2,7 $\pm$ 0,15*↑
Гемоглобін, г/л	83,4 $\pm$ 2,5	106,2 $\pm$ 3,1*↑
Лейкоцити, $\times 10^9/л$	28,6 $\pm$ 1,1	19,3 $\pm$ 0,9*↓
Загальний протеїн, г/л	29,8 $\pm$ 1,3	38,4 $\pm$ 1,1*↑
Альбуміни, г/л	11,5 $\pm$ 0,6	18,1 $\pm$ 0,7*↑
Білірубін загальний, мкмоль/л	6,8 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 0,3*↓
Лужна фосфатаза, Од/л	179,2 $\pm$ 11,3	135,6 $\pm$ 8,4*↓

Примітки: ↑↓ – напрямок зміни показника відповідно до групи контролю; * статистично достовірна відмінність порівняно з групою контролю, $p < 0,05$.

У курчат контрольної групи, уражених еймеріозом, спостерігалось зниження рівня еритроцитів ($1,8 \pm 0,12 \times 10^{12}/л$) і гемоглобіну ($83,4 \pm 2,5$ г/л), що вказує на розвиток анемії, типової для важкого перебігу кокцидіозу. Кількість лейкоцитів була підвищеною ($28,6 \pm 1,1 \times 10^9/л$), що свідчить про наявність запального процесу.

У дослідній групі, де птахи отримували Бровітакокцид, рівень еритроцитів та гемоглобіну був вірогідно вищим ($2,7 \pm 0,15 \times 10^{12}/л$ та $106,2 \pm 3,1$ г/л відповідно, $p < 0,05$), що вказує на нормалізацію процесів кровотворення. Кількість лейкоцитів залишалася у межах фізіологічної норми ($19,3 \pm 0,9 \times 10^9/л$, $p < 0,05$), що додатково підтверджує зменшення запального фону.

Біохімічний аналіз крові показав, що у курчат контрольної групи спостерігалось зниження рівня загального протеїну ($29,8 \pm 1,3$ г/л), підвищення активності лужної фосфатази ($179,2 \pm 11,3$ Од/л) та білірубину, що свідчить про порушення білкового і пігментного обміну, характерне для кокцидіозу.

У дослідній групі біохімічні показники були ближчими до норми: загальний протеїн становив $38,4 \pm 1,1$ г/л ($p < 0,05$), активність лужної фосфатази – $135,6 \pm 8,4$ Од/л ($p < 0,05$), а вміст альбумінів і білірубину не виходив за межі фізіологічних значень.

Дані гематологічного й біохімічного аналізу підтверджують, що використання Бровітакокциду сприяє відновленню гомеостазу у птиці, зменшенню клінічних проявів еймеріозу та покращенню загального фізіологічного стану.

Для проведення дослідів було обрано курчат-бройлерів віком 14–16 діб, оскільки саме в цьому віці у птахів найчастіше виявляють клінічні прояви еймеріозу при спонтанному зараженні. Початок другої декади життя бройлерів характеризується активним ростом, формуванням кишкової мікрофлори та становленням імунної відповіді. У цей період зростає чутливість слизової оболонки кишечника до збудників кокцидіозу, зокрема *Eimeria tenella*, *E. acervulina* та *E. maxima*, які є найбільш патогенними для молодняку.

Крім того, інвазування у зазначеному віковому проміжку відповідає типовому польовому перебігу еймеріозу в умовах промислового птахівництва, що дозволяє максимально наблизити умови експерименту до виробничих реалій. Застосування антикокцидний препарат саме в цей час забезпечує найбільшу ефективність у перериванні циклу розвитку еймерій та профілактиці важких уражень кишечника, що є критично важливим для збереження продуктивності та життєздатності поголів'я.

Висновки

1. У курчат, спонтанно уражених еймеріями *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* та *Eimeria maxima*, захворювання перебігало з вираженими клінічними ознаками та супроводжувалося високою летальністю у контрольній групі на рівні 20,8 %. Інвазія зумовила значні морфологічні, біохімічні й патологоанатомічні зміни, зокрема розвиток анемії, порушення білкового обміну та тяжкі макроскопічні зміни, за яких загальний індекс ураження кишечника птиці, що загинула, досягав 3,6 бала.

2. Застосування препарату Бровітакокцид (2 г/л, 7діб) забезпечило збереженість 95,8 % бройлерів та

високу протикокцидйну ефективність. За початкових показників ЕІ – 100% та П – 17,5±1,0 тис. ооцист/г, на 28-му добу в дослідній групі екстенсивність інвазії знизилася до 4,3%, а інтенсивність – до 4,8±0,9 тис. ооцист/г, при цьому редукція становила 83,8 %.

3. Використання Бровітакокциду забезпечило поступове відновлення гематологічного та біохімічного статусу курчат, що найбільш виражено проявилось на 28-му добу дослідження. На цей термін відзначено: нормалізацію рівнів еритроцитів ($2,7 \pm 0,15 \times 10^{12}/л$, $p < 0,05$), гемоглобіну ($106,2 \pm 3,1$ г/л, $p < 0,05$), лейкоцитів ($19,3 \pm 0,9 \times 10^9/л$, $p < 0,05$), загального протеїну ($38,4 \pm 1,1$ г/л, $p < 0,05$) та активності лужної фосфатази ($135,6 \pm 8,4$ Од/л, $p < 0,05$), що свідчить про відновлення гомеостазу та зниження запальної реакції.

4. У дослідній групі курчат відмічено значно нижчу летальність (4,2 % проти 20,8 % у контролі), кращу збереженість поголів'я (95,8 % проти 79,2 %), а також менш виражені патологічні зміни кишечника (зниження загального індексу ураження в 2,4 раза), що підтверджує захисну дію препарату і його безпеку для тварин

Перспективи подальших досліджень спрямовані на вивчення впливу Бровітакокциду на імунологічні показники організму птиці та моніторинг можливої резистентності еймерій до діючих речовин препарату.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Автори заявляють, що проведені дослідження повністю відповідають загальноприйнятим нормам гуманного ставлення до тварин та принципам біоетики. Експериментальна частина роботи виконувалася з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV) та Директиви ЄС 2010/63/EU про захист тварин, що використовуються для наукових цілей. Керівництво господарства надало письмову згоду на проведення досліджень та залучення птиці в експеримент. Під час досліду забезпечувалися належні зоогігієнічні умови утримання птиці, збалансована годівля та мінімізація будь-яких стресових чи больових факторів. Для встановлення ступеня ураження органів травного каналу та оцінки профілактично-лікувальної ефективності препарату «Бровітакокцид» проводили патологоанатомічний розтин (некропсію) виключно тієї птиці, яка загинула природним шляхом у ході експерименту.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання ІІІ та технологій на основі ІІІ

Автори заявляють, що не використовували штучний інтелект або технології на основі ІІІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. Blake, D. P., Knox, J., Dehaeck, B., Huntington, B., Rathinam, T., Ravipati, V., Ayoade, S., Gilbert, W., Adebambo, A. O., Jatau, I. D., Raman, M., Parker, D., Rushton, J., & Tomley, F. M. (2020). Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Veterinary Research*, 51(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00837-2>
2. Bohach, M. V., & Skalachuk, V. V. (2018). Porivnialna otsinka efektyvnosti Brovitakok-tydyu ta zasobu "Amprolev-Plus" za zmishanoho perebihu kryptosporydiozu ta eimeriozu teliat [Comparative evaluation of the effectiveness of Brovitacoc-cid and the product "Amprolev-Plus" in a mixed course of cryptosporidiosis and eimeriosis in calves]. *Visnyk Sumskoho Natsionalnoho Ahrarnoho Universytetu. Seriya: Vetrynarna Medytsyna*, (1), 133–135. (in Ukrainian)
3. Chapman, H. D. (1997). Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathology*, 26(2), 221–244. <https://doi.org/10.1080/03079459708419208>
4. Dalloul, R. A., & Lillehoj, H. S. (2006). Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 5(1), 143–163. <https://doi.org/10.1586/14760584.5.1.143>
5. Debbou-Iouknane, N., Benbarek, H., & Ayad, A. (2018). Prevalence and aetiology of coccidiosis in broiler chickens in Bejaia province, Algeria. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 85(1), a1590. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v85i1.1590w>
6. El-Shall, N. A., Abd El-Hack, M. E., Albaqami, N. M., Khafaga, A. F., Taha, A. E., Swelum, A. A., El-Saadony, M. T., Salem, H. M., El-Tahan, A. M., AbuQamar, S. F., El-Tarabily, K. A., & Elbestawy, A. R. (2022). Phytochemical control of poultry coccidiosis: A review. *Poultry Science*, 101(1), 101542. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101542>
7. Fatoba, A. J., & Adeleke, M. A. (2018). Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. *Journal of Parasitic Diseases*, 42(4), 483–493. <https://doi.org/10.1007/s12639-018-1048-1>
8. Chalalai, T., Promsut, W., Hinkhao, K., Hengphrathani, T., Sangsakul, K., Bhavabhutanon, N., & Nonkookhetkhong, T. (2025). Effects of probiotics and amprolium on performance, lesion scores, oocyst shedding, and histopathological changes in *Eimeria tenella*-infected broiler chickens. *Veterinary World*, 8(6), 1400–1410. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2025.1400-1410>
9. Giannenas, I., Florou-Paneri, P., Papazahariadou, M., Christaki, E., Botsoglou, N. A., & Spais, A. B. (2003). Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archives of Animal Nutrition*, 57(2), 99–106. <https://doi.org/10.1080/0003942031000107299>
10. Gutty, B., Stybel, V., Hariv, I., Maksymovych, I., Buczek, K., Staniec, M., Milczak, A., Bushueva, I., Kulish, S., Shcherbyna, R., & Samura, T. (2019). Influence of Amprolium and Brovitacocid on the protein synthesizing function of the liver and enzyme activity in turkey blood serum during *Eimeria* invasion. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 10(2), 723–729.
11. Kharyv, I. I. (2011). Vplyv brovitakoktydyu ta plodiv roztoropshi plamiastoi na morfolohichni pokaznyky krovi intaktykh indykyv [The influence of brovitacocides and fruits of thistle on morphological parameters of blood of intact turkeys]. *Naukovo-Tekhnichniy Biuletyn Instytutu Biolohii Tvaryn i DNDKI Vetrynaryi ta Kormovykh Dobavok*, 12(3–4), 239–243. (in Ukrainian)
12. Huang, Y., Ruan, X., Li, L., & Zeng, M. (2017). Prevalence of *Eimeria* species in domestic chickens in Anhui province, China. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(4), 1014–1019. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0927-1>

13. Kadykalo, S., Roberts, T., Thompson, M., Wilson, J., Lang, M., & Espeisse, O. (2018). The value of anticoccidials for sustainable global poultry production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(3), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.004>
14. Kotcumbas, I. Y., Bisyuk, I. Yu., Gorzheyev, V. M., Malyk, O. G., Zhila, M. I., Kosenko, Yu. M., Chajkovska, O. I., Muzika, V. P., Kotcumbas, G. I., Paterega, I. P., Mazurkevich, A. J., Levickij, T. R., Brezvin, O. M., Kushnir, I. M., Perig, Zh. M., & Ivaniv, M. I. (2013). *Klinichni doslidzhennya veterinarnih preparativ ta kormovih dobavok: Monografiya* [Clinical trials of veterinary drugs and feed additives: Monograph]. TOV «Vidavnychij dim «SAM». (in Ukrainian)
15. Kruchynenko, O. V. (2021). Spreading of hen gastrointestinal parasitoses. *Scientific Progress & Innovations*, 3, 236–241. <https://doi.org/10.31210/visnyk2021.03.29>
16. Mathis, G. F., Lumpkins, B., Cervantes, H. M., Fitz-Coy, S. H., Jenkins, M. C., Jones, M. K., Price, K. R., & Dalloul, R. A. (2025). Coccidiosis in poultry: Disease mechanisms, control strategies, and future directions. *Poultry Science*, 104(5), 104663. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104663>
17. Soares Júnior, J. C., Itoyama, B. F., Beretta, B. M. S., Hossotani, C. M. d. S., Silva, M. S. C., Silva, G. S. d., Nakamura, A. A., Lopes, F. L., & Meireles, M. V. (2023). Identification of *Eimeria* spp. in domestic chickens raised in alternative poultry production systems in the State of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 32(4), e011123. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612023075>
18. Stybel, V., Guttyj, B., Hariv, I., Slivinska, L., & Prijma, O. (2019). Effect of “Amprolinsyl” and “Amprolium 22%” on morphological indices of blood of turkeys for eimeria invasion. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 21(94), 157–162. <https://doi.org/10.32718/nvlvet9429>
19. Taylor, J., Walk, C., Misiura, M., Sorbara, J.-O. B., Giannenas, I., & Kyriazakis, I. (2022). Quantifying the effect of coccidiosis on broiler performance and infection outcomes in the presence and absence of control methods. *Poultry Science*, 101(4), 101746. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101746>
20. Vilienė, V., Racevičiūtė-Stupelienė, A., Murawska, D., Gesek, M., Matusevičius, P., Miknienė, Z., & Nutautaitė, M. (2024). Evaluation of herbal anticoccidials on growth performance in experimentally infected broiler chickens. *Agriculture*, 14(12), 2261. <https://doi.org/10.3390/agriculture14122261>
21. Williams, R. B. (2002). Anticoccidial vaccines for broiler chickens: Pathways to success. *Avian Pathology*, 31(4), 317–353. <https://doi.org/10.1080/03079450220148988>

ORCID

- | | | |
|----------------|---|---|
| D. Feshchenko |  | https://orcid.org/0000-0002-4811-2488 |
| Yu. Dovhiy |  | https://orcid.org/0000-0002-9927-0646 |
| A. Berezovskyi |  | https://orcid.org/0000-0002-5825-9504 |
| O. Zghozinska |  | https://orcid.org/0000-0003-4622-6307 |



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Comparative expression profiling of *gliP* and *cyp51A* genes in *Aspergillus fumigatus* isolates from chickens and poultry feed

S. A. M. Aswad

Article info

Correspondence Author

S. A. M. Aswad

E-mail:

shahad.a.a@uodiyala.edu.iqCollege of Veterinary
Medicine, University of
Diyala,
Al-Muradia, Old Baghdad-
Baqubah Road, Baqubah,
32001, Diyala, Iraq

Citation: Aswad, S. A. M. (2026). Comparative expression profiling of *gliP* and *cyp51A* genes in *Aspergillus fumigatus* isolates from chickens and poultry feed. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 109–114. doi: 10.31210/spi2026.29.02.16

Aspergillus fumigatus is an important opportunistic fungal pathogen that frequently contaminates organic substrates on poultry farms, including feed, litter, dust, and airborne particles, thereby posing a significant risk of respiratory infection to birds. The objective of this study was to compare the relative expression levels of two critical target genes, *gliP* and *cyp51A*, in poultry- and feed-associated *Aspergillus fumigatus* isolates, utilizing *beta-actin* as the internal reference gene. A total of fifteen *Aspergillus fumigatus* strains were investigated, comprising ten clinical isolates recovered from infected chickens and five control strains obtained from poultry feed samples. Extraction of total RNA and subsequent complementary DNA synthesis were performed, and relative gene expression values were determined using the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) via the comparative cycle threshold method. The transcriptional activity of each sample was normalized against *beta-actin*, and fold-change values were calculated relative to the feed-derived calibrator control group based on the $2^{-\Delta\Delta CT}$ equation. The experimental data demonstrated a consistent and significant transcriptional activation of both target genes in the chicken-derived group. Specifically, the relative expression levels of the *gliP* gene, which is directly involved in the nonribosomal peptide synthesis of the immunosuppressive mycotoxin gliotoxin, were highly upregulated in infected chicken isolates compared to the poultry feed-derived control strains, exhibiting mean fold-change values of 5.03 ± 0.29 versus 1.06 ± 0.16 , respectively. Concurrently, the expression of the *cyp51A* gene, which encodes lanosterol 14- α -demethylase and serves as a primary target molecule for azole antifungal drugs, was also prominently increased in chicken-derived isolates compared to the controls, with mean fold-change values reaching 4.30 ± 0.39 versus 1.15 ± 0.27 , respectively. The presented results suggest that host-associated *Aspergillus fumigatus* infection in chickens is characterized by the co-activation of pathways governing both mycotoxin production and environmental azole adaptation. Ultimately, the combined expression profile of *gliP* and *cyp51A* could serve as a targeted molecular panel for the preliminary screening and surveillance of pathogenicity potential and antifungal resistance characteristics in poultry-associated *Aspergillus fumigatus* isolates prior to implementing more extensive phenotyping or mutation sequencing assays.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, *gliP*, *cyp51A*, *beta-actin*, poultry, feed, qRT-PCR.

Порівняльний аналіз профілів експресії генів *gliP* та *cyp51A* в ізолятах *Aspergillus fumigatus* від курей та зі зразків корму для птиці

Ш. А. М. Асвад

Факультет ветеринарної
медицини, Університет
Діялі,
м. Баакуба, Ірак

Aspergillus fumigatus є важливим опортуністичним патогенним грибом, який часто контамінує органічні субстрати на птахофабриках, зокрема корми, підстилку та пил, створюючи тим самим значний ризик виникнення респіраторної інфекції у птиці. Метою цього дослідження було порівняти відносні рівні експресії двох критичних генів-мішеней, *gliP* та *cyp51A*, в ізолятах *Aspergillus fumigatus*, пов'язаних із птицею та кормами, використовуючи ген *beta-actin* як внутрішній референтний контроль. Загалом було досліджено 15 штамів *Aspergillus fumigatus*, що включали 10 клінічних ізолятів, виділених від інфікованих курчат, та 5 контрольних штамів, отриманих із зразків пташиного корму. Виділення загальної РНК, подальший синтез комплементарної ДНК та кількісну зворотну транскрипційно-полімеразну ланцюгову реакцію (qRT-PCR) проводили за методом порівняльного циклічного порогу. Транскрипційну активність кожного зразка нормалізували щодо гена *beta-actin*, а кратність змін розраховували відносно калібрувальної контрольної групи штамів із корму на основі формули $2^{-\Delta\Delta CT}$. Експериментальні дані продемонстрували стабільну та статистично значущу транскрипційну активацію обох генів-мішеней у групі ізолятів від птиці. Зокрема, рівні відносної експресії гена *gliP*, який бере безпосередню участь у нерибосомальному синтезі пептидів імуносупресивного мікотоксину гліотоксину, були значно підвищені в ізолятах від інфікованих курчат порівняно з контрольними штамми з корму, демонструючи середні значення кратності змін $5,03 \pm 0,29$ проти $1,06 \pm 0,16$ відповідно. Водночас експресія гена *cyp51A*, який кодує ланостерол-14-альфа-деметилазу та є основною молекулою-мішенню для азольних протигрибкових препаратів, також суттєво зросла в ізолятах від курчат порівняно з контролем, досягаючи середніх значень $4,30 \pm 0,39$ проти $1,15 \pm 0,27$ відповідно. Отримані результати свідчать, що інфекція *Aspergillus fumigatus* у птиці характеризується одночасною активацією метаболічних процесів, які відповідають як за продукування мікотоксинів, так і за адаптацію до азолів у довкіллі. Комбінований профіль експресії *gliP* та *cyp51A* може слугувати цільовою молекулярною панеллю для попереднього скринінгу й нагляду за рівнем патогенності та характеристиками протигрибкової резистентності ізолятів *Aspergillus fumigatus* у птахівництві перед проведенням більш високоякісних тестів на фенотипову чутливість або секвенування мутацій.

Ключові слова: *Aspergillus fumigatus*, *gliP*, *cyp51A*, *beta-actin*, птиця, корм, qRT-PCR.



Бібліографічний опис для цитування: Асвад Ш. А. М. Порівняльний аналіз профілів експресії генів *gliP* та *cyp51A* в ізолятах *Aspergillus fumigatus* від курей та зі зразків корму для птиці. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 109–114.

Introduction

Aspergillus fumigatus is a thermotolerant filamentous fungus capable of producing large quantities of airborne conidia. It is widely distributed in organic substrates such as litter, dust, feed ingredients, and decomposing plant material. In poultry production systems, respiratory aspergillosis is triggered when birds inhale high concentrations of spores, particularly in environments characterized by poor ventilation, high humidity, contaminated bedding, or immunosuppressive stress. The economic significance of the disease is associated with reduced performance in infected flocks, high chick mortality, and sciatic inertia in infected young or susceptible birds [1].

Aspergillus fumigatus colonizes the respiratory tract, but this is not its only significant aspect. The fungus is endowed with a flexible genome and a wide array of virulence-associated traits that allow it to survive various host-imposed stresses. These traits include thermotolerance, antioxidant strategies for adapting to oxidative stress, the production of secondary metabolites (SMs), biofilm formation, and immune modulation. These characteristics underscore why the simple isolation and identification of poultry isolates should be replaced with targeted molecular analysis of genes associated with virulence and survivability [2].

Several virulence-associated pathways, including gliotoxin biosynthesis, play a crucial role as immunosuppressive mechanisms under specific environmental and infection-related conditions, making this metabolic route particularly interesting in *A. fumigatus*. The specific biological function of the *gliP* gene, which encodes a nonribosomal peptide synthetase involved in the earliest stages of gliotoxin biosynthesis, renders it a key molecular target and genetic marker. Analyzing this gene helps determine the potential of an isolate to express regulator-mediated pathogenic traits associated with toxin production [3].

Similarly, the *cyp51A* gene is a critical molecular target in *A. fumigatus* because it encodes lanosterol 14- α -demethylase, the primary target of azole antifungal drugs. Reduced azole susceptibility can be associated with mutations in the *cyp51A* sequence or alterations in its expression. Consequently, evaluating veterinary isolates is increasingly important, as antifungal resistance can develop from prior clinical exposure, environmental selection, or selective pressure from agricultural azoles [4].

Regarding virulence and azole adaptation, recent transcriptomic studies have demonstrated that azole stress does not affect a single resistance locus, but rather modulates the expression of multiple pathways governing sterol metabolism, membrane homeostasis, xenobiotic transport, and stress responses, ultimately affecting cell survival. Consequently, *cyp51A* remains a functionally relevant target within the azole adaptation mechanisms of *A. fumigatus*, involving either the gene itself or its regulatory network [5].

Poultry feed is a critical environmental source of fungal contamination in poultry houses, as spores and

mycotoxigenic fungi can spread throughout the production chain, leading to disease outbreaks. Thus, feed-associated isolates may serve as a link between environmental exposure and avian disease, while potentially acting as a reservoir for resistance-associated traits. This underscores the importance of conducting integrated molecular surveillance on both chicken- and feed-derived *A. fumigatus* isolates, rather than studying them in isolation [6].

Accurate and sensitive quantification of target gene expression is achieved by quantitative real-time PCR (qPCR), a strategy that utilizes beta-actin as a reference gene for normalization. For the current analysis, *gliP* and *cyp51A* were selected as target genes due to their functional relevance to virulence (specifically toxin-related pathogenicity) and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. This approach provides a targeted interpretation of transcriptional activity associated with pathogenicity and resistance in *A. fumigatus* isolates obtained from poultry sources [7].

The aim of the study

The objective of this study was to compare the relative expression levels of two target genes (*gliP* and *cyp51A*) in poultry- and feed-associated *Aspergillus fumigatus* isolates, utilizing *beta-actin* as the internal reference gene. Additionally, this study aimed to evaluate these transcriptional profiles in the context of host-associated virulence and potential environmental azole selection pressure, thereby establishing a baseline for the integrated molecular surveillance of *A. fumigatus* within poultry production chains.

Materials and methods

Study design and sample groups

Aspergillus fumigatus samples recovered from poultry and poultry feed were investigated. A total of ten *A. fumigatus* samples were isolated from 101 chickens, and five *A. fumigatus* strains were obtained from poultry feed in this study. For the relative expression analysis, the fungal isolates obtained from infected chickens were compared to the isolates obtained from poultry feed. The feed-derived *A. fumigatus* strains served as the calibrator control group for determining relative gene expression values.

RNA extraction and cDNA synthesis

Extraction of total RNA was performed using the TransZol Up Plus RNA Kit (TransGen Biotech, China), followed by immediate conversion to cDNA using the EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen Biotech, China). The primers were synthesized by Macrogen (Republic of Korea), and real-time PCR amplification was performed using the SaCycler-96 Real-Time PCR System (Sacace Biotechnology, Italy). This workflow strictly adhered to standard qPCR reporting principles regarding sample handling, primer information, reaction composition, and normalized relative expression analysis [8].

Primers used for qRT-PCR analysis

The primer sequences utilized in the qRT-PCR assays are specified below. The target genes, *gliP* and *cyp51A*, are involved in the resistance and virulence phenotypes, while *beta-actin* was used as the internal reference gene for normalization. All primer sequences used in the qRT-PCR assays are shown in [Table 1](#).

Table 1

Primers used for qRT-PCR analysis of *gliP*, *cyp51A*, and *beta-actin* genes

Gene	Primer	Sequence (5'→3')
<i>gliP</i>	gliP-F	AGCACCACAAAGGTCATTCC
<i>gliP</i>	gliP-R	GTAGAGGCTATGCCGTGAGC
<i>cyp51A</i>	RT-cyp51A-F	GGTGCCGATGCTATGGCTTACGGC
<i>cyp51A</i>	RT-cyp51A-R	GGTCTGTTCGGTTCCAAAGCCG
<i>beta-actin</i>	beta-actin-F	TGCTCTCGTTATCGACAATGGT
<i>beta-actin</i>	beta-actin-R	CATCGTCACCGCGGAAA

Primer preparation

Lyophilized primers were reconstituted in nuclease-free *ddH₂O* to a stock concentration of 100 pmol/μl. To prepare the working primer solutions (10 pmol/μl), 10 μl of the stock primer was mixed with 90 μl of nuclease-free *ddH₂O* to reach a final working volume of 100 μl. These working solutions were subsequently used for the PCR analysis. Finally, stock and working primers were stored at -20 °C until use.

Quantitative real-time PCR reaction mixture

The qRT-PCR reaction was prepared in a final reaction volume of 20 μl, which consisted of master mix, forward and reverse primers, cDNA template, and nuclease-free water, as detailed in [Table 2](#).

Table 2

Quantitative real-time PCR reaction mixture

Reagent	Volume per reaction
Master Mix	10 μl
Forward primer (10 pmol/μl)	0.4 μl
Reverse primer (10 pmol/μl)	0.4 μl
cDNA template	5 μl
Nuclease-free water	4.2 μl
Final reaction volume	20 μl

Relative expression calculation

Relative expression levels were calculated using the comparative Ct method, where the Ct value of each individual target gene was normalized with respect to *beta-actin*. The calibrator group consisted of the feed-derived *A. fumigatus* isolate group. Analysis of the relative gene expression was performed according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [9], using the step-by-step equations detailed in [Table 3](#).

Table 3

Step-by-step equations for the calculation of relative gene expression using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method

Step	Equation
1	$\Delta CT = Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{reference gene beta-actin})$
2	$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{chicken-derived sample}) - \text{mean } \Delta CT(\text{feed-derived control group})$
3	Fold change = $2^{-\Delta\Delta CT}$

Statistical analysis

Real-time qPCR expression results were statistically summarized as mean ± standard error (SE). For the analysis of ΔCT , $\Delta\Delta CT$, and fold-change values, P-values were calculated by comparing *A. fumigatus* isolates from infected chickens with those from poultry feed. Differences were deemed statistically significant when $P < 0.05$.

Results and discussion

The expression levels of both target genes were significantly upregulated in *Aspergillus fumigatus* isolates obtained from infected chickens compared to those recovered from poultry feed. Based on the ΔCT values normalized against *beta-actin*, both *gliP* and *cyp51A* exhibited lower ΔCT values in the chicken-derived group, demonstrating a higher baseline level of transcriptional activity relative to the feed-derived control strains. The fold-change calculations confirmed that *gliP* possessed the highest relative expression level, closely followed by *cyp51A*.

Relative expression of the *gliP* gene

The expression levels of the *gliP* gene were investigated via real-time PCR in *Aspergillus fumigatus* isolates. To determine the statistical significance of the transcriptional alterations, relative expression values were compared between chicken- and feed-derived strains, as summarized in [Table 4](#).

Table 4

Relative expression statistics for the *gliP* gene in chicken- and feed-derived *Aspergillus fumigatus* isolates, Mean±SE

Groups	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	Fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Chicken-derived isolates	2.65±0.08	-2.31±0.08	5.03±0.29
Feed-derived control strains	4.96±0.25	0.00±0.25	1.06±0.16
P-value	P=0.00039	P=0.00039	P<0.0001

In *A. fumigatus* isolates recovered from infected chickens, the expression level of the *gliP* gene was highly upregulated. In the chicken-derived group, the ΔCT value was 2.65±0.08, whereas in the feed-derived control group, it was 4.96±0.25. The calculated $\Delta\Delta CT$ values were -2.31±0.08 for infected chicken isolates and 0.00±0.25 for the calibrator controls ($P < 0.01$). The final fold-change value reached 5.03±0.29 in chicken-derived isolates versus 1.06±0.16 in the feed-derived strains. This confirms that the difference in *gliP* gene expression between the two experimental groups was highly significant ($P < 0.0001$).

Relative expression of the *cyp51A* gene

The transcriptional activity of the *cyp51A* gene in *Aspergillus fumigatus* isolates was evaluated using real-time PCR. To analyze the molecular patterns of azole adaptation, the relative expression profiles were compared between chicken-derived and feed-derived strains, as summarized in [Table 5](#).

Table 5

Relative expression statistics for the *cyp51A* gene in chicken- and feed-derived *Aspergillus fumigatus* isolates, Mean±SE

Groups	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	Fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Chicken-derived isolates	1.85±0.13	-2.05±0.13	4.30±0.39
Feed-derived control strains	3.90±0.41	0.00±0.41	1.15±0.27
P-value	P=0.00542	P=0.00542	P<0.0001

The *cyp51A* gene was highly upregulated in *A. fumigatus* isolates recovered from infected chickens. In the chicken-derived group, the ΔCT value was 1.85±0.13, compared to 3.90±0.41 in the feed-derived control group. The calculated $\Delta\Delta CT$ value was -2.05±0.13 for the chicken-derived isolates versus 0.00±0.41 for the calibrator controls (P<0.001). The final fold-change value reached 4.30±0.39 in chicken-derived isolates compared to 1.15±0.27 for the control strains. This confirms that the difference in *cyp51A* expression between the two experimental groups was highly significant (P<0.0001).

The current data demonstrated that *gliP* and *cyp51A* were significantly upregulated in *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from infected chickens compared to poultry feed-derived control strains. Notably, this expression pattern is highly biologically relevant, as *gliP* is directly associated with gliotoxin biosynthetic processes, while *cyp51A* is involved in both ergosterol biosynthesis and azole resistance mechanisms. This synchronized two-gene profile indicates that pathways governing pathogenicity and antifungal adaptation are co-activated in *A. fumigatus* strains circulating within poultry production environments.

The strong induction of *gliP* observed in this study is consistent with recent findings indicating that *A. fumigatus* can derepress gliotoxin biosynthetic pathways during biofilm formation [10]. According to a previous report by Gomez-Lopez and Fernandez-Fernandez, gliotoxin production exhibits strain- and time-dependent dynamics that directly correlate with the transcriptional activation of genes involved in the regulation and synthesis of this mycotoxin. This supports the conclusion that increased *gliP* expression reflects a biologically active toxin metabolism rather than an accidental transcriptional event [3].

Moreover, the observed *cyp51A* upregulation is consistent with recent transcriptomic analyses demonstrating that *A. fumigatus* responds to azole selective pressure by differentially expressing pathways involved in sterol biosynthesis, stress adaptation, and membrane function to survive antifungal exposure. This analysis aligns with the previously established mode of action for this key target gene [5], even though the present study did not directly evaluate phenotypic antifungal susceptibility.

Similar veterinary clinical evidence highlights *cyp51A* as a key target in animal-associated *Aspergillus fumigatus* isolates. An extensive surveillance study conducted in the Netherlands identified azole resistance in veterinary *A. fumigatus* isolates, which was almost exclusively mediated by *cyp51A* tandem repeats (TRs). This

underscores the necessity of incorporating *cyp51A* analysis into molecular studies to discriminate between animal and poultry isolates, especially when environmental selective pressure is assumed [4].

Moreover, environmental studies reinforce the value of *cyp51A* as a principal surveillance target. Investigations utilizing *A. fumigatus* isolates recovered from clinical cases demonstrated that *cyp51A* mutations are associated with elevated azole minimum inhibitory concentration (MIC) values, highlighting the persistence of environmental transmission risks. These findings align with current research on poultry and feed origins, as both matrices are susceptible to environmental fungal contamination and subsequent selective pressure from agricultural azoles [11].

Previously, it was emphasized that both *cyp51A* sequencing and resistance phenotype determination remain the cornerstone for clinical and epidemiological analysis [12]. The present results do not demonstrate resistance in isolation; however, elevated *cyp51A* expression offers a molecular marker signal to be further explored through susceptibility testing and mutation screening investigations, which require subsequent validation studies [12].

The selection of poultry and feed samples is also substantiated by reports in the literature indicating that feed contamination may serve as an environmental reservoir for azole-resistant *Aspergillus* species. The detection of *Aspergillus* in poultry feed highlights its role as a nutritional substrate and a continuous fungal reservoir, leading to avian exposure and increased flock-level infection pressure. This underscores the necessity of managing feed quality alongside bird health within the integrated production chain [6].

Variations in the azole resistance marker gene are localized across 3 to 7 kb, and not all studies support a single-gene interpretation. Ma et al. [13] analyzed a non-*cyp51A* mutant azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strain and demonstrated that resistance is coupled with genome-wide transcriptomic and metabolomic changes, including alterations to oxidative stress and cellular response pathways. This evidence provides additional context distinct from a purely *cyp51A*-only explanation, suggesting that the observed *cyp51A* upregulation should be viewed as one player within an extended resistance network [12].

Veterinary data on azole resistance remain sparse and variable across species, sample sources, countries, and testing methods, as shown in a systematic review of *Aspergillus* isolates from animals and their environment. Such a lack of consensus is noteworthy, highlighting that the high *cyp51A* expression observed in this study cannot be extrapolated to all poultry farms or all animal-associated *A. fumigatus* isolates in the absence of broader surveillance datasets [14].

Transcription factor studies also illustrate the regulatory complexity of azole resistance. Paul et al. outlined the necessity of FfmA and AtrR for correctly modulating wide-ranging expression programs in *Aspergillus fumigatus*, which affect pathways beyond just *cyp51A* [15]. This indicates that the observed *cyp51A* increase may reflect the downstream output of upstream

regulatory networks rather than a single gene-specific event. Caution is also warranted when interpreting *gliP* expression. Current reviews on the virulence of *A. fumigatus* point to complex interactions among fungal growth, host immune status, secondary metabolites, stress tolerance, and tissue invasion during disease development [16], thus, while *gliP* upregulation strengthens the potential for gliotoxin biosynthesis, it should not be considered the sole factor governing pathogenicity in chicken-derived isolates.

While highly sensitive, the qRT-PCR method relies on stable reference gene expression, similar amplification efficiencies, and high sample quality. Indeed, in recent discussions of relative quantification, it has been acknowledged that the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method makes specific assumptions regarding normalization and amplification behavior between target and reference assays [7]. Consequently, future work should report on primer efficiencies and include melt-curve or specificity confirmation to lend further confidence to the gene expression estimates.

The elevated *gliP* expression in chicken-derived isolates implies that poultry-associated *A. fumigatus* strains possess enhanced gliotoxin-related activity. In avian aspergillosis, this feature is critical because respiratory infection requires successful spore germination, hyphal development, and immunoevasion. In future studies, however, *gliP* expression should be interpreted in conjunction with histopathology, fungal burden estimation, and direct toxin quantification [17].

While the increase in *cyp51A* expression serves as a marker for the activation of sterol biosynthesis or resistance-associated adaptation, it does not confirm phenotypic azole resistance without accompanying phenotypic data. Essential next steps include antifungal susceptibility testing, sequencing of *cyp51A* hotspot regions, and the evaluation of promoter tandem repeats or other resistance-associated mutations. This integrated approach would enable correlating expression profiles with the actual risk of resistance in poultry-derived isolates [18]. Furthermore, the present study features a relatively small sample size for exploratory molecular research. To strengthen the scientific inference, future studies should encompass more farms and feed sources, while longitudinal sampling across multiple years would improve the representativeness of the monitored populations. Due to the pervasive environmental nature of *Aspergillus* exposure, large-scale surveillance is required to link these molecular findings with feed quality, litter management, ventilation status, and the total fungal burden [19, 20].

Despite these limitations, the initial insights gleaned from the combined evaluation of *gliP* and *cyp51A* expression remain highly valuable. These two genes represent complementary facets of *A. fumigatus* biology: *gliP* reflects potential toxigenic activity, whereas *cyp51A* characterizes the regulation of azole targets and subsequent resistance development. When normalized against *beta-actin*, this two-gene screening panel could facilitate the preliminary molecular surveillance of poultry-associated *A. fumigatus* isolates prior to

implementing more costly phenotypic testing and sequencing assays.

Conclusions

In this study, a significant upregulation of two critical genes was demonstrated in chicken-derived *Aspergillus fumigatus* isolates compared to poultry feed-derived control strains. The final fold-change calculations confirmed that *gliP* possessed the highest relative expression level, increasing 5.03 ± 0.29 -fold, which indicates a strong transcriptional activation related to gliotoxin biosynthesis and potential fungal virulence. Another prominently upregulated target molecule was *cyp51A*, which exhibited a 4.30 ± 0.39 -fold increase, functionally confirming its co-activation during host-associated adaptation. Overall, this two-gene combination represents a targeted molecular panel for assessing the pathogenic and antifungal resistance-associated characteristics of avian- and feed-associated *A. fumigatus* isolates. To consolidate the clinical and biological validity of these markers, future large-scale studies should incorporate expanded sample sizes, investigate feed-to-bird transmission dynamics, perform phenotypic antifungal susceptibility testing, and include *cyp51A* mutation sequencing alongside direct gliotoxin quantification.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The author confirms that the studies were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), national bioethical norms, and international standards for the humane treatment of animals. The *Aspergillus fumigatus* samples investigated in this study were recovered from clinical veterinary cases and feed substrates during routine diagnostic and sanitary screening. No direct experimental interventions, invasive procedures, or clinical sampling were performed on live animals within the framework of this research.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The author states that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The author expresses sincere gratitude to the Environment and Water Department of the Ministry of Science and Technology for providing the necessary support and facilities to conduct this research.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The author declares that no generative AI or AI-assisted technologies were used during the preparation, writing, translation, or language polishing of this manuscript. The final content was fully authored and reviewed by the researcher, who takes sole responsibility for the work.

References

1. Shaapan, R., & Girh, Z. (2024). Overview of aspergillosis in poultry - a review. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 55(2), 407–419. <https://doi.org/10.21608/ejvs.2023.234624.1602>
2. Earle, K., Valero, C., Conn, D. P., Vere, G., Cook, P. C., Bromley, M. J., Bowyer, P., & Gago, S. (2023). Pathogenicity and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Virulence*, 14(1), 2172264. <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2172264>
3. Gomez-Lopez, A., & Fernandez-Fernandez, C. (2024). Molecular characterization of gliotoxin synthesis in a biofilm model of *Aspergillus fumigatus*. *Biofilm*, 8, 100238. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2024.100238>
4. van Dijk, M. A. M., Buil, J. B., Tehupeiory-Kooreman, M., Broekhuizen, M. J., Broens, E. M., Wagenaar, J. A., & Verweij, P. E. (2024). Azole resistance in veterinary clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in the Netherlands. *Mycopathologia*, 189, 50. <https://doi.org/10.1007/s11046-024-00850-5>
5. Hokken, M., Coolen, J., Steenbreker, H., Zoll, J., Baltussen, T., Verweij, P., & Melchers, W. (2023). The transcriptome response to azole compounds in *Aspergillus fumigatus* shows differential gene expression across pathways essential for azole resistance and cell survival. *Journal of Fungi*, 9(8), 807. <https://doi.org/10.3390/jof9080807>
6. Odebode, A., Vanreppelen, G., Resendiz-Sharpe, A., & Van Dijk, P. (2024). First report of azole-resistant *Aspergillus* species in poultry feed in Kabale, South West, Uganda. *Notulae Scientiae Biologicae*, 16(2), 11789. <https://doi.org/10.55779/nsb16211789>
7. Zalewski, D., & Bogucka-Kocka, A. (2025). RQdeltaCT: an open-source R package for relative quantification of gene expression using delta Ct methods. *Scientific Reports*, 15(1), 29762. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-11822-0>
8. Bustin, S. A., Ruijter, J. M., van den Hoff, M. J. B., Kubista, M., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Tran, N., Rödiger, S., Untergasser, A., Mueller, R., Nolan, T., Milavec, M., Burns, M. J., Huggett, J. F., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2025). MIQE 2.0: Revision of the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments guidelines. *Clinical Chemistry*, 71(6), 634–651. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf043>
9. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
10. Bruns, S., Seidler, M., Albrecht, D., Salvenmoser, S., Remme, N., Hertweck, C., Brakhage, A. A., Kniemeyer, O., & Müller, F.-M. C. (2010). Functional genomic profiling of *Aspergillus fumigatus* biofilm reveals enhanced production of the mycotoxin gliotoxin. *Proteomics*, 10(17), 3097–3107. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000129>
11. Gong, J., Huang, J., Liu, Y., Zhang, Y., & Gao, Y. (2024). Unveiling environmental transmission risks: Comparative analysis of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* clinical and environmental isolates from Yunnan, China. *Microbiology Spectrum*, 12(12), e01594-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01594-24>
12. Zubovskaia, A. (2025). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: Epidemiology, diagnosis, and treatment considerations. *Journal of Fungi*, 11(10), 731. <https://doi.org/10.3390/jof11100731>
13. Ma, W., Kang, Y., Li, Q., Wang, P., & Jia, W. (2025). Transcriptomic and metabolomic analysis of a non-cyp51A mutant azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolated from Ningxia, China. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1666905. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1666905>
14. Dieste-Pérez, L., Holstege, M. M. C., de Jong, J. E., & Heuvelink, A. E. (2025). Azole resistance in *Aspergillus* isolates from animals or their direct environment (2013–2023): A systematic review. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1507997. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1507997>
15. Paul, S., Stamnes, M. A., & Moye-Rowley, W. S. (2023). Interactions between the transcription factors FfmA and AtrR are required to properly regulate gene expression in the fungus *Aspergillus fumigatus*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 13(10), Article jkad173. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad173>
16. Frías-De-León, M. G., García-Salazar, E., & Acosta-Altamirano, G. (2023). Virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*. In M. Razzaghi-Abyaneh, M. Rai, & M. Shams-Ghahfarokhi (Eds.), *Aspergillus and aspergillosis: Advances in genomics, drug development, diagnosis and treatment*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.111778>
17. Hussein, A. S., Mohammed, S. H., & Mohammed, B. L. (2025). Molecular and immunological detection of gliotoxin genes in *Aspergillus fumigatus* isolated from patients with invasive pulmonary aspergillosis. *Eastern Ukrainian Medical Journal*, 13(1), 189–197. [https://doi.org/10.21272/eumj.2025;13\(1\):189-197](https://doi.org/10.21272/eumj.2025;13(1):189-197)
18. Zeng, M., Zhou, X., Yang, C., Liu, Y., Zhang, J., Xin, C., Qin, G., Liu, F., & Song, Z. (2023). Comparative analysis of the biological characteristics and mechanisms of azole resistance of clinical *Aspergillus fumigatus* strains. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1253197. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1253197>
19. Schürch, S., Gindro, K., Schnee, S., Dubuis, P.-H., Codina, J. M., Wilhelm, M., Riat, A., Lamoth, F., & Sanglard, D. (2023). Occurrence of *Aspergillus fumigatus* azole resistance in soils from Switzerland. *Medical Mycology*, 61(11), myad110. <https://doi.org/10.1093/mmy/myad110>
20. Gomes, B., Dias, M., Cervantes, R., Pena, P., Carolino, E., Caetano, L. A., Viegas, S., & Viegas, C. (2025). Poultry farms as reservoirs of azole-resistant fungi: Occupational health risks in agricultural facilities. *One Health*, 21, 101230. <https://doi.org/10.2139/ssrn.5369870>

ORCID

S. A. M. Aswad 

<https://orcid.org/0009-0006-9293-555X>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Clinical and morphological features of lipofibromas in dogs with dyslipidemia

T. Budnik[✉] | S. Huralska | O. Pinskyi | S. Zaika | Z. Khomenko

Article info

Correspondence Author
T. Budnik
E-mail:
tatjanabudnik@ukr.netPolissia National University,
Staryi Blvd., 7,
Zhytomyr, 10008, Ukraine**Citation:** Budnik, T., Huralska, S., Pinskyi, O., Zaika, S., & Khomenko, Z. (2026). Clinical and morphological features of lipofibromas in dogs with dyslipidemia. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 115–122. doi: 10.31210/spi2026.29.02.17

Over the past 5 years, oncological pathologies of the skin and subcutaneous tissue have occupied a leading place among all tumors in small animals. According to modern morphological classifications, a significant proportion are neoplasms of mesenchymal origin, in particular, neoplasms of adipose tissue. Lipid structure tumors are formed from adipocytes and are characterized by different ratios of fat and connective tissue components. The results of the study showed that lipofibroma was most often diagnosed in dogs aged 8–12 years. In terms of anatomical localization, most cases of neoplasms were found on the trunk of animals. In terms of gender distribution, the pathology was predominantly found in females, most of whom were spayed. Biochemical changes in the blood of animals with dyslipidemia are characterized by an almost twofold increase in cholesterol concentration compared to the group of animals aged 1–4 years. The concentration of glucose and triglycerides in the blood serum of adult dogs was 49.4 % higher than in animals of the first group. The triglyceride content in the blood serum of animals in the second group was 1.2 times higher than in animals in the first group. The concentration of LDL was 35 % higher in animals aged 8 to 12 years than in the group of animals aged 4–8 years. Lipid profile disorders are accompanied by the accumulation of excess adipose tissue. It was found that among Labrador dogs, the average body condition score on a 9-point scale ranged from 6 to 8 points, and the body weight was 40.78 ± 5.29 kg. In terms of reproductive status, lipofibroma was found in 72.7 % of spayed Labradors. Among Sharpei dogs, only 33.3 % of animals were slightly overweight, and the average body weight was 25.33 ± 4.00 kg. Among French Bulldogs, only 20 % of cases were found in males. Among spaniels, lipofibroma was found in 57.2 % of females. In the mixed breed group, all animals were spayed, and only 33.3 % of the animals studied were male. Among pugs, 50 % of the animals were spayed and 100 % of the animals were obese. The results of our studies confirmed the existence of a relationship between the degree of obesity and changes in biochemical blood parameters in dogs aged 8–12 years. Cytologically, the presence of mature adipocytes with a large optically empty vacuole was established, and spindle-shaped fibroblastic-type cells were noted. Histologically, the neoplasia consisted of mature adipose tissue separated by layers of dense fibrous tissue.

Keywords: lipid metabolism, benign neoplasms, biochemical blood tests, cytomorphological assessment, histology.

Клініко-морфологічні особливості ліпофібром у собак на тлі дисліпідемії

Т. С. Буднік | С. В. Гуральська | О. В. Пінський | С. С. Заїка | З. В. Хоменко

Поліський
Національний університет,
м. Житомир, Україна

За останні 5 років онкологічні патології шкіри та підшкірної клітковини займають провідне місце серед усіх пухлин у дрібних тварин. Відповідно до сучасних морфологічних класифікацій значну частку становлять неоплазії мезенхімального походження, зокрема новоутворення жирової тканини. Пухлини ліпідної структури формуються з адипоцитів і характеризуються різним співвідношенням жирового та сполучнотканинного компонентів. За результатами проведеного дослідження встановлено, що ліпофіброма найчастіше діагностується у собак віком 8–12 років. За анатомічною локалізацією найбільше випадків новоутворень було виявлено на тулубі тварин. За статевим розподілом патології переважно зареєстрована у самок, при цьому більшість із них була стерилізована. Біохімічні зміни в крові тварин при дисліпідемії характеризуються підвищенням концентрації холестерину майже вдвічі порівняно з групою тварин віком 1–4 років. Концентрація глюкози та тригліцеридів у сироватці крові дорослих собак була на 49,4 % вищою, ніж у тварин першої групи. Вміст тригліцеридів у сироватці крові тварин другої групи був у 1,2 раза вищим, ніж у тварин першої групи. Концентрація ЛПНЩ була на 35 % вищою у тварин віком від 8 до 12 років, ніж у групі тварин віком 4–8 років. Порушення ліпідного профілю супроводжується накопиченням надлишку жирової тканини. Встановлено, що серед собак породи лабрадор середній показник вгодованості за 9-бальною шкалою становив 6–8 балів, а середня маса тіла – $40,78 \pm 5,29$ кг. За репродуктивним статусом ліпофіброма зустрічалася у 72,7 % стерилізованих лабрадорів. Серед собак породи шарпей за оцінкою вгодованості лише 33,3 % тварин мали легку надмірну вагу, а середній показник маси тіла становив $25,33 \pm 4,00$ кг. У собак породи французький бульдог лише у 20 % випадків зустрічалося у самців. Серед собак породи спанієль ліпофіброму було виявлено у 57,2 % самок. У групі метисів усі тварини були стерилізованими, 33,3 % досліджуваних тварин були самцями. Серед собак породи мопс 50 % тварин були стерилізовані, а 100 % мали ожиріння. Результати наших досліджень підтвердили наявність залежності між ступенем ожиріння та змінами в біохімічних показниках крові собак віком 8–12 років. Цитологічно встановлено наявність зрілих адипоцитів з великою оптично порожньою вакуолою, відмічали веретеноподібні клітини фібробластичного типу. Гістологічно неоплазія складалася зі зрілої жирової тканини, розділеної прошарками щільної волокнистої тканини.

Ключові слова: ліпідний обмін, доброякісні новоутворення, біохімічні дослідження крові, цитоморфологічна оцінка, гістологія.**Бібліографічний опис для цитування:** Буднік Т. С., Гуральська С. В., Пінський О. В., Заїка С. С., Хоменко З. В. Клініко-морфологічні особливості ліпофібром у собак на тлі дисліпідемії. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 115–122.

Вступ

Неоплазії досить часто зустрічаються серед домашніх м'ясоїдних тварин, зокрема котів та собак, причому їх частота зростає із збільшенням тривалості життя тварин. Новоутворення в сучасній літературі розглядають як гетерогенну групу захворювань, що відрізняється клітинним походженням, механізмом розвитку та прогностичною оцінкою [10–11, 19–20, 34]. Доброякісні пухлини жирової тканини у собак переважно представлені ліпомами, ліпофібромами та ліпоангіофібромами, які становлять відносно невелику частку серед усіх доброякісних неоплазій [10, 11, 26].

Ліпофіброма собак – це доброякісне новоутворення шкіри та підшкірної клітковини, яке складається зі зрілих адипоцитів, розділених пучками фіброзної сполучної тканини. Пухлини характеризуються повільним ростом, мають чіткі межі, не метастазують, а клінічний прогноз є сприятливим [22–23]. Макроскопічно пухлина має щільну, еластичну консистенцію, гладку, однорідну, рідко часточкову структуру поверхні. Ретроспективні дослідження показують, що після хірургічного видалення рецидиви спостерігаються рідко [21]. Частіше ліпофіброми діагностують у кобелів середнього віку, від 5 до 10 років, на голові та кінцівках. Крім того, дана неоплазія може виникати в порожнині рота, що ускладнює диференційну діагностику з іншими доброякісними пухлинами м'яких тканин [4, 18, 24].

Гістоархітектоніка пухлини представлена зрілими адипоцитами, розділеними пучками колагенових волокон і фібробластами, що формують сполучнотканинну стромальну складову пухлини. Цитоморфологічні ознаки ліпофіброми представлені клітинами з однорідною цитоплазмою, які мають дрібні та округлі ядра; атипія відсутня. Відзначається низький рівень проліферативної активності, клітини локалізовані всередині пухлинного вузла і не проростають у сусідні тканини [1–2, 25, 28, 30].

Формування жирових пухлин зумовлене віковими змінами, генетичною схильністю, місцевими травмами, запальними процесами та метаболічними порушеннями. Надлишкова маса тіла, гормональний дисбаланс, порушення жирового обміну можуть стимулювати проліферацію адипоцитів і фіброзної стромы [18, 33].

Зміни ліпідного обміну у собак супроводжуються порушенням синтезу, транспортування та мобілізації ліпідів у тканинах організму. Такі порушення зазвичай проявляються надмірним відкладенням жирової тканини та дисбалансом холестерину й тригліцеридів у крові тварин [9, 13].

Таким чином, вивчення порушень ліпідного обміну у собак дозволить своєчасно ідентифікувати фактори ризику розвитку ліпофібром [14].

Мета дослідження

Метою дослідження було встановлення комплексу клітинних і морфологічних змін у собак, асоційованих із розвитком дисліпідемії.

Матеріали і методи

Дослідження проводили протягом 2022–2026 років на базі ветеринарної клініки VetHelp м. Житомира. До досліджуваної вибірки увійшли лише випадки з підтвердженим клінічним та гістологічним діагнозом ліпофіброми, при цьому патологію було виявлено у 37 тварин. Лабораторні дослідження крові у тварин виконували під час первинного звернення до ветеринарної клініки.

Біохімічний аналіз крові проводили на автоматичному біохімічному аналізаторі Mindray BS-240Vet.

Цитологічні зразки отримували методом тонкогolkової аспіраційної біопсії (ТГАБ) з подальшим фарбуванням препаратів за допомогою набору Diff-Quik Leucodif 200 (Erba, Чехія).

Мікроскопічне дослідження виконували на мікроскопі Proway XSZ-PW109B, а мікрофотографування зразків здійснювали при збільшенні $\times 100$ та $\times 1000$ для детального вивчення їхніх морфологічних особливостей.

Гістологічні дослідження матеріалу проводили після хірургічного видалення новоутворення за стандартною процедурою фіксації у 10 % нейтральному формаліні. Матеріал для дослідження заливали у парафінове середовище ParaplastPlus®. Після цього блоки нарізали на автоматичному мікротомі (товщина зрізів – 5 мкм).

Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, після чого монтували у синтетичний бальзам. Отримані препарати досліджували за допомогою біологічного біокулярного мікроскопа ProWay XSZ-PW109B. Мікрофотографування виконували при збільшенні $\times 100$. Обробку, маркування структур та корекцію масштабу здійснювали за допомогою програмного забезпечення ImageView.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили із застосуванням методів варіаційної статистики з використанням відповідних статистичних критеріїв для оцінювання достовірності виявлених відмінностей між досліджуваними показниками.

Результати та їх обговорення

Протягом тривалого ретроспективного періоду з 2022 по 2026 рік на базі ветеринарної клініки VetHelp (м. Житомир) лікарями було офіційно зареєстровано та клінічно підтверджено 37 випадків виникнення ліпофіброми у собак різних порід і вікових груп. (*табл. 1*).

Аналіз віддалених результатів лікування показав, що рецидив доброякісної жирово-фіброзної пухлини (ліпофіброми) спостерігався лише в одному випадку серед усієї вибірки обстежених тварин, що свідчить про низький ступінь повторного розростання цієї неоплазії після її радикального видалення. При дослідженні вікових характеристик схильності до даної патології було встановлено, що пік захворюваності чітко припадав на вікову групу собак від 4 до 8 років, де було зафіксовано найбільше

хворих – 19 випадків, що становить значну частку від загальної кількості пацієнтів.

Аналіз розподілу за породною ознакою показав, що ліпофіброма найчастіше траплялася у тварин таких порід: лабрадор – 11 випадків, спанієль – 7 та шарпей – 6 (*табл. 2*). Серед досліджуваних тварин найменшу кількість випадків зафіксовано у такс.

Таблиця 1

Поширеність новоутворень жирової тканини у собак на базі ветеринарної клініки VetHelp (м. Житомир) за 2022–2026 роки

Тип пухлини	Кількість випадків / рецидивів, шт.	Вік тварини, років	Кількість тварин
Ліпофіброма	37 / 1	1–4	3
		4–8	19
		8–12	7
		≥ 12	8
Ліпома	45 / 10	1–4	14
		4–8	16
		8–12	7
		≥ 12	8
Ліпосаркома	3 / 0	1–4	0
		4–8	0
		8–12	1
		≥ 12	2
Ліпоангіофіброма	1 / 0	1–4	0
		4–8	0
		8–12	0
		≥ 12	1
Ліпофібро- саркома	1 / 0	1–4	0
		4–8	0
		8–12	1
		≥ 12	0

Таблиця 2

Розподіл випадків ліпофібром у собак за породою та локалізацією патологічного процесу

Порода	Кількість випадків, шт. / %	Локалізація	Кількість за локалізацією, шт.
Лабрадор	11 / 29,7	голова	2
		тулуб	8
		кінцівки	1
Спанієль	7 / 18,9	голова	0
		тулуб	4
		кінцівки	3
Шарпей	6 / 16,2	голова	1
		тулуб	3
		кінцівки	2
Французький бульдог	5 / 13,5	голова	0
		тулуб	3
		кінцівки	2
Метис	3 / 8,0	голова	0
		тулуб	2
		кінцівки	1
Кане-корсо	2 / 5,4	голова	0
		тулуб	2
		кінцівки	0
Мопс	2 / 5,4	голова	0
		тулуб	1
		кінцівки	1
Такса	1 / 2,7	голова	0
		тулуб	0
		кінцівки	1

За локалізацією пухлини випадки розподілено на групи (голова, тулуб, кінцівки), при цьому у лабрадорів виявлено 8 випадків (72,7 %) на тулубі, 2 (18,2 %) – на голові, 1 (9,1 %) – на кінцівках;

у спанієлів – 4 (57,1 %) на тулубі, 3 (42,9 %) – на кінцівках; у шарпей – 3 (50 %) на тулубі, 2 (33,3 %) – на кінцівках, 1 (16,7 %) – на голові (*рис. 1 А*).

За локалізацією розміщення пухлин усі випадки були розподілені на три групи: голова, тулуб та кінцівки (*табл. 2*). У собак породи лабрадор 6 випадків (54,5 %) локалізувалися на тулубі, 2 випадки (18,2 %) – на голові тварини та 1 випадок (9,1 %) – на кінцівках.

У спанієлів зафіксовано 4 випадки (57,1 %) – на тулубі, 3 випадки (42,9 %) – на кінцівках. У собак породи шарпей 3 випадки (50 %) припадали на тулуб, 2 випадки (33,3 %) – на кінцівки та в 1 випадку пухлина була локалізована на голові (16,7 %) (*рис. 1 А*).

У такси випадок ліпофіброми був локалізований на кінцівках. У результаті проведених досліджень встановлено, що ця патологія найчастіше виникає у собак на тулубі. Частка новоутворень із локалізацією на кінцівках становила 29,7 % від загальної кількості досліджених випадків.

При макроскопічному дослідженні виявлено, що ліпофіброма має капсульовану структуру та гладеньку поверхню без ознак горбкуватості. Консистенція пухлини щільна, без ознак флуктуації; новоутворення виступає на кілька сантиметрів над поверхнею тіла, що дозволяє чітко диференціювати його від навколишніх тканин (*рис. 1 Б*).

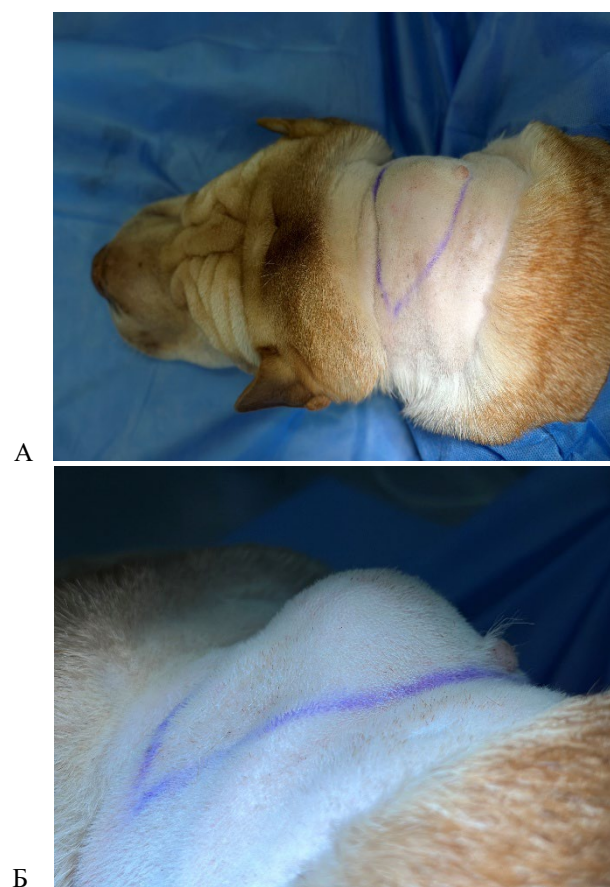


Рис. 1. Макроскопічний вигляд ліпофіброми перед хірургічним втручанням:

А – в ділянці шиї собаки породи шарпей (вигляд зверху);
Б – вигляд новоутворення, що виступає над поверхнею тіла тварини

У досліджуваних тварин візуально відзначали надмірну масу тіла. Оцінювання вгодованості здійснювали за 9-бальною шкалою Body Condition Score. За результатами дослідження тварини отримали від 6 до 9 балів, що свідчить про надмірну вгодованість. Серед собак породи лабрадор показник вгодованості коливався в межах від 6 до 8 балів: 2 тварини мали легку надмірну масу тіла, 2 – надмірну вагу, 5 – ожиріння, 2 – виражене ожиріння. Середній вік собак у цій групі становив $8,66 \pm 3,09$ років, а маса тіла – $40,78 \pm 5,29$ кг. За репродуктивним статусом ліпофіброму діагностовано у 72,7 % стерилізованих лабрадорів. У сук породи лабрадор виявлено більшу схильність до ожиріння порівняно з кобелями.

Серед собак породи шарпей 4 тварини з 6 були нестерилізованими. За оцінкою вгодованості 33,3 % тварин мали легку надмірну вагу, 33,3 % – надмірну вагу, 16,7 % – ожиріння, 16,7 % – виражене ожиріння. Середня маса тіла становила $25,33 \pm 4,00$ кг.

Серед собак породи французький бульдог у 80,0 % випадків ожиріння виявляли у сук (усі тварини були стерилізованими). Середня маса тіла дослідної групи становила $10,84 \pm 1,55$ кг. За результатами оцінки вгодованості 20,0 % тварин мали надмірну вагу, 20,0 % – ожиріння, 60,0 % – виражене ожиріння.

У групі собак породи кане-корсо розподіл за статтю був рівномірним: 50,0 % – суки, 50,0 % – кобелі. За оцінкою вгодованості всіх тварин було віднесено до групи з ожирінням.

Серед собак породи спаніель 42,8 % тварин були стерилізованими. За статевим розподілом ліпофіброму виявлено у 57,2 % сук. Середній вік тварин у

групі становив $9,57 \pm 3,25$ років, середня маса тіла – $16,57 \pm 1,81$ кг.

У групі метисів 100,0 % тварин мали ознаки ожиріння, середня маса тіла становила $34,77 \pm 7,81$ кг. Усі тварини були стерилізованими, причому 66,7 % досліджуваних тварин становили суки.

Серед собак породи мопс 50,0 % тварин були нестерилізованими. За оцінкою вгодованості 100,0 % тварин мали ожиріння, середній показник маси тіла становив $11,35 \pm 0,92$ кг.

Установлено, що за статевим розподілом ожиріння частіше траплялося у сук, ніж у кобелів, і становило 56,75 % від загальної кількості.

Для оцінки загального стану та виявлення патологічних змін проводили клінічний аналіз крові. Отримані результати свідчать, що у собак із підвищеною масою тіла спостерігалися зміни показників ліпідного обміну. Підвищення вмісту тригліцеридів, холестерину та зсув профілю ліпопротеїдів у бік фракцій низької та дуже низької щільності відображають ожиріння – індуковану дисліпідемію [17, 32].

У результаті досліджень встановлено, що підвищення концентрації глюкози в крові при порушенні ліпідного обміну зумовлене розвитком інсулінорезистентності, яка формується внаслідок надмірної продукції вільних жирних кислот і про-запальних медіаторів жировою тканиною. Цей процес у дослідних тварин супроводжувався пропорційним зростанням вмісту тригліцеридів, що свідчить про тісний взаємозв'язок порушень вуглеводного та ліпідного обмінів (*табл. 3*).

Таблиця 3

Біохімічні показники крові собак із ліпофібромою залежно від віку, $M \pm SD$

Показники	1 група (1–4 роки), n=3	2 група (4–8 років), n=19	3 група (8–12 років), n=7	4 група (≥ 12 років), n=8
Глюкоза, ммоль/л	$5,45 \pm 1,32$	$6,75 \pm 0,89$	$8,14 \pm 1,26^*$	$6,03 \pm 0,98$
Холестерин, ммоль/л	$4,49 \pm 0,94$	$7,84 \pm 1,03^*$	$6,17 \pm 0,84$	$6,08 \pm 0,98$
Тригліцериди, ммоль/л	$0,72 \pm 0,11$	$1,45 \pm 0,45^{***}$	$1,56 \pm 0,47^{**}$	$1,42 \pm 0,36^{***}$
ЛПНЩ, ммоль/л	$0,28 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,14^{***}$	$1,35 \pm 0,25^{***}$	$0,95 \pm 0,13^{***}$
ЛПВЩ, ммоль/л	$2,78 \pm 0,18$	$2,87 \pm 0,18$	$4,36 \pm 0,52^{***}$	$3,54 \pm 0,49^{**}$

Примітки: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (в порівнянні з першою групою).

Зокрема, у собак віком від 4 до 8 років концентрація глюкози становила $6,75 \pm 0,89$ ммоль/л, а рівень тригліцеридів – $1,45 \pm 0,45$ ммоль/л. У групі тварин віком від 8 до 12 років вміст глюкози в сироватці крові становив $8,14 \pm 1,26$ ммоль/л, що на 49,4 % вірогідно вище порівняно з групою тварин віком 1–4 роки, а концентрація тригліцеридів досягала $1,56 \pm 0,47$ ммоль/л. Показник тригліцеридів у тварин віком 8–12 років був у 2,2 раза вищим, ніж у групі віком 1–4 роки.

Підвищені концентрації тригліцеридів пов'язані з резистентністю до інсуліну та є головною особливістю дисліпідемії [6–8]. В інсулінорезистентних станах у собак із розвитком гіпертригліцеридомії відбувається збільшення постачання вуглеводів, особливо глюкози, до печінки [3]. Концентрація тригліцеридів у сироватці крові зростає у собак з ожирінням, що, як правило, оцінюється за показником стану тіла – BCS [32].

Підвищення холестерину у сироватці крові собак виникає внаслідок зменшення кліренсу ліпопротеїдів та збільшення синтезу холестерину в печінці. Хронічні запальні та метаболічні процеси, а також високожирова або енергетично надмірна дієта стимулюють синтез ліпідів у печінці та накопичення холестерину в крові [5, 17, 32].

Найвищу концентрацію холестерину було виявлено у групі тварин віком 8–12 років, що свідчить про вікові зміни ліпідного обміну та тенденцію до розвитку дисліпідемії (*табл. 3*). Зміни в обміні ліпопротеїдів за рахунок зростання часток ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) та ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ) відбуваються в організмі тварин внаслідок накопичення надлишку адипозної тканини, зумовленого підвищеним синтезом тригліцеридів і холестерину в печінці [3, 17, 32].

Найвищі показники ліпопротеїдів у сироватці крові спостерігалися у групі тварин віком від 8 до

12 років. Концентрація ЛПНЩ у них становила $1,35 \pm 0,25$ ммоль/л, що на 35,0 % більше, ніж у групі тварин віком 4–8 років. Рівень ЛПНЩ у тварин 3-ї групи був у 4,8 раза вищим, ніж у 1-й групі.

Концентрація ЛПВЩ у сироватці крові тварин 3-ї групи становила $4,36 \pm 0,52$ ммоль/л, що на 51,9 % більше порівняно з 2-ю групою та на 56,8 % більше, ніж у 1-й групі. Отримані дані свідчать про наявність взаємозв'язку між віком тварин та інтенсивністю обмінних процесів. Установлено, що з віком та збільшенням маси тіла у собак спостерігається тенденція до підвищення показників вуглеводного та ліпідного обмінів.

Для верифікації пухлинної природи та оцінки клітинних компонентів тваринам проводили тонко-голкову аспіраційну біопсію новоутворення. Отримані цитологічні препарати мали характерний жирний макроскопічний вигляд, що свідчило про їх ліпоматозну природу. Мікроскопічне дослідження мазків ТГАБ виявило двофазну клітинну популяцію, представлену зрілими адипоцитами та веретеноподібними мезенхімальними клітинами [27].

Клітинний склад препаратів ТГАБ є гіпоклітинним і представлений значними скупченнями великих клітин із невеликими стиснутими ядрами, що зміщені до периферії великою оптично порожньою цитоплазматичною вакуолею, яка вказує на високий вміст ліпідів (рис. 2). Зазначені клітинні структури є типовими адипоцитами.

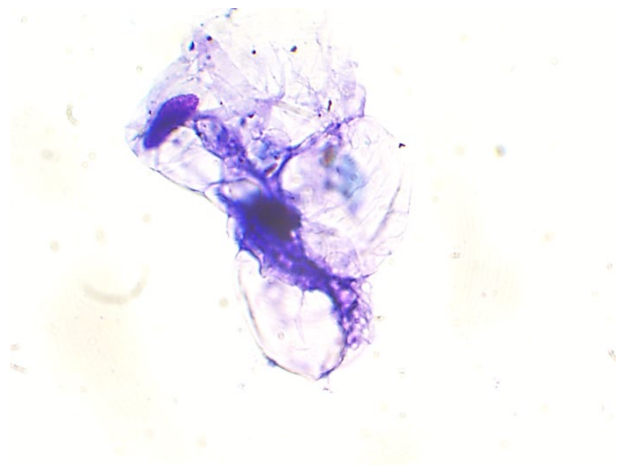


Рис. 2. Цитограма тонкогोलкового аспірату ліпофіброми собак. Виявляється комплекс зрілих адипоцитів із ліпідними вакуолями. Фарбування Diff-Quik (Leucodif 200), збільшення $\times 100$

Фон препарату містить незначну кількість ліпідного матриксу, утвореного вільними краплями жиру. У міжклітинному просторі спостерігаються фрагменти сполучної тканини, що містять еритроцити та фіброцити – веретеноподібні клітини з центрально розташованими ядрами (рис. 3).

Фон препарату містить невелику кількість жирового матриксу, утвореного вільними краплями жиру. У міжклітинному просторі спостерігаються фрагменти сполучної тканини, що містять еритроцити та фіброцити – веретеноподібні клітини довгої

втягнутої форми з центральним розміщенням ядер (рис. 3).

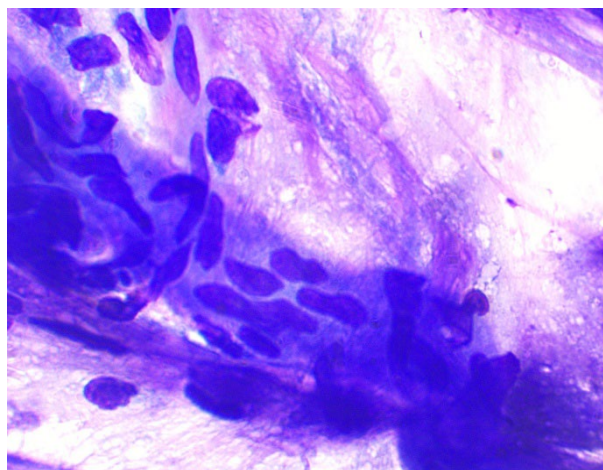


Рис. 3. Цитограма тонкогोलкового аспірату ліпофіброми собак. Спостерігаються фрагменти фіброзної сполучної тканини з веретеноподібними клітинами (фіброцитами).

Фарбування Diff-Quik (Leucodif 200), збільшення $\times 1000$

Описана цитологічна картина дозволяє диференціювати ліпофіброму від ліпосаркоми, яка складається з веретеноподібних клітин із помірною когезивністю, має світло-блакитну цитоплазму, поодинокі невеликі вакуолі з чіткими контурами та рідко – цитоплазматичні краплі. Ядра у клітинах ліпосаркоми є плеоморфними, від округлих до видовжених із загостреними кінцями, зазвичай неправильної форми, діаметром 10–16 мкм, із вираженим хроматиновим малюнком. Ядерця клітин непомітні або дрібні, рідко містять ядерні псевдовключення та виявляють базофілію [12].

Для міксоїдної ліпосаркоми характерна наявність ліпобластів із поодинокими або множинними чітко окресленими цитоплазматичними вакуолями, які деформують ядро та виявляють високу проліферативну активність [31].

Цитоморфологічні ознаки ліпоми визначаються присутністю однотипних зрілих адипоцитів із великою вакуолізованою цитоплазмою та невеликим периферично розташованим ядром. Клітини є рівномірними за розміром і формою, без сполучнотканинного матриксу та колагенових волокон. У ліпомах не виявляють веретеноподібних клітин та фіброзних структур [29].

Для встановлення морфологічної структури пухлини проведено макроскопічний аналіз матеріалу, отриманого після хірургічного видалення у собаки породи кане-корсо (рис. 4). Фрагмент новоутворення був локалізований на тулубі, у вентральній ділянці живота, зліва поблизу другого пакета молочних залоз.

Досліджуваний матеріал розміром 6 см $\times$ 5 см $\times$ 2 см мистив сосок молочної залози разом із прилеглою ділянкою шкіри. Новоутворення капсульоване, овальної форми, із рівною та гладкою зовнішньою поверхнею, добре відмежоване від навколишніх тканин. На розрізі пухлина мала жовтуватий колір,

м'який та однорідний жировий матрикс, який становив близько 85 % новоутворення, без видимих ознак некрозу, крововиливів чи інфільтративного росту (рис. 5).



Рис. 4. Макроскопічний вигляд видаленої ліпофіброми у собаки породи кане-корсо

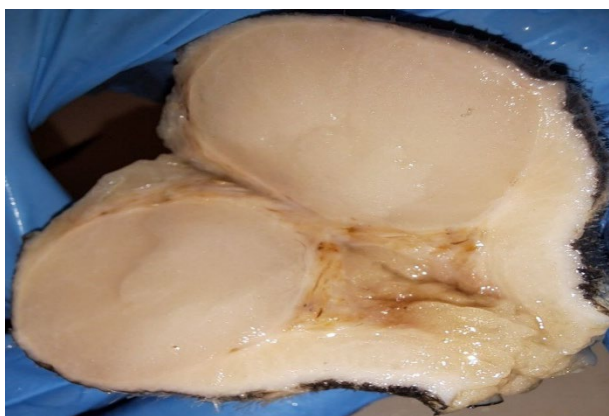


Рис. 5. Макроскопічний вигляд ліпофіброми собаки. Внутрішня структура новоутворення на розрізі

Для встановлення остаточного діагнозу та підтвердження результатів цитологічного дослідження проведено гістологічний аналіз матеріалу, отриманого після хірургічного видалення пухлини. Гістологічним дослідженням встановлено, що ліпофіброма є доброякісним м'якотканинним новоутворенням із двокомпонентним складом (рис. 6).

Строма представлена сполучною тканиною з фібробластами та колагеновими волокнами, що утворюють пухкі або помірно щільні фіброзні прошарки між групами зрілих адипоцитів. Виявлені гістологічні ознаки підтверджують доброякісність пухлини, де зріла жирова тканина змішана з колагеновими стромальними компонентами без клітинної атипії та високої мітотичної активності.

Фібробласти, розташовані у колагеновій матриці, формують стромальну основу ліпофіброми, при цьому в структурі пухлини трапляються невеликі судини. На гістологічному препараті візуалізуються адипоцити – основні клітини жирової тканини, які відповідають за депонування ліпідів (рис. 7).

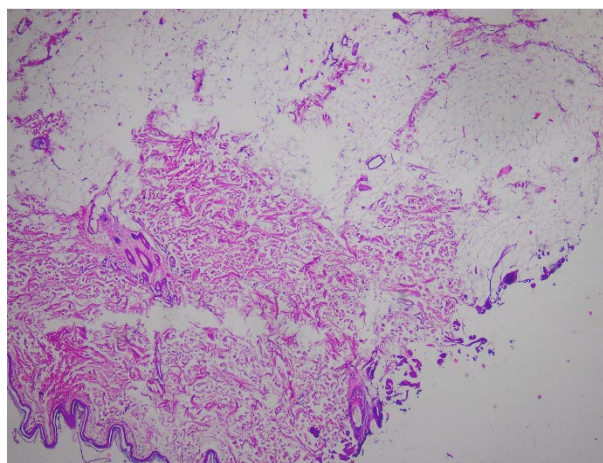


Рис. 6. Мікроструктура ліпофіброми собак із прилеглою ділянкою шкіри. Виявляється чітке розмежування жирового та фіброзного компонентів новоутворення.

Фарбування гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 100$

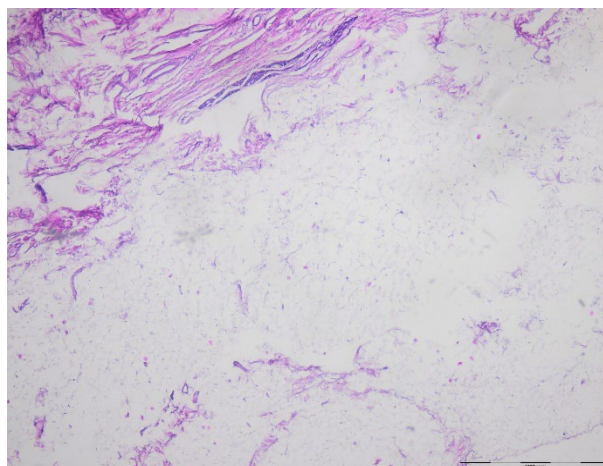


Рис. 7. Гістологічна структура ліпофіброми собак. Ділянка новоутворення з вираженим жировим і фіброзним компонентами та поодинокими дрібними судинами.

Фарбування гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 100$

Гістологічно адипоцити мають круглу або дещо овальну форму з великою жировою вакуолею, яка заповнює понад 70,0 % цитоплазми та зміщує ядро до периферії. Вони містять переважно тригліцериди, які під час фарбування гематоксиліном та еозином розчиняються й візуалізуються як порожнини. Адипоцити розташовані групами або тяжами й розділені тонкими прошарками сполучної тканини, між якими проходять дрібні судини строми (рис. 8).

За фарбування гематоксиліном та еозином ліпома має гомогенну проліферацію зрілих адипоцитів без клітинної атипії [30]. Ліпобластома характеризується наявністю часточок ліпобластів у складі жирової тканини, які розділені клітинними фіброзними перегородками, а також має плексиформну капілярну сітку та об'ємну міксоїдну строму [29].

Ліпома веретеноподібних клітин гістологічно виглядає як суміш зрілих адипоцитів і маловиражених

веретеноподібних клітин на міксоїдному або фіброзному фоні з присутністю грубоволокнистого колагену [16, 22].

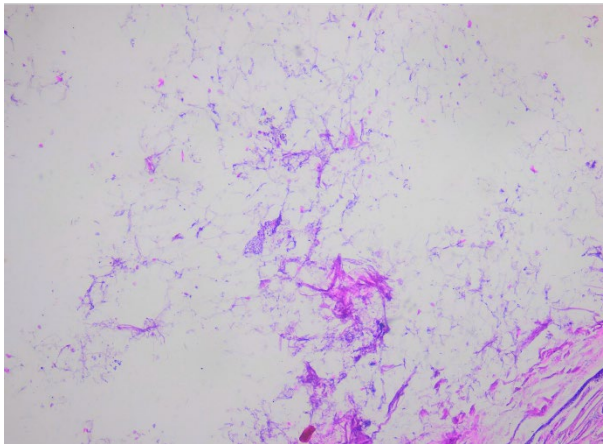


Рис. 8. Гістологічна структура ліпофіброми собак. Візуалізуються групи й тяжі адипоцитів, розділені прошарками фіброзної стромы із дрібними судинами. Фарбування гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 100$

Ліпосаркома гістологічно характеризується щільною проліферацією однорідних веретеноподібних клітин із помірною ядерною атипією, розташованих скупченнями [12].

Висновки

Ліпофіброма у собак є доброякісним новоутворенням підшкірної жирової тканини, що складається зі зрілих адипоцитів та фіброзної стромы з фібробластами й колагеновими волокнами. Ліпофіброми найчастіше виявляються у тварин із надмірною масою тіла, що підкреслює зв'язок між ожирінням і формуванням жирових пухлин із фіброзним компонентом. Патогенетично це пов'язано з порушенням жирового та вуглеводного обмінів, інсулінорезистентністю та системними змінами тканин організму. У тварин віком 8–12 років спостерігається підвищення вмісту глюкози, холестерину, тригліцеридів та ЛПНЩ порівняно з молодими тваринами. Цитоморфологічні ознаки ліпофіброми характеризуються наявністю однотипних зрілих адипоцитів із великою вакуолізованою цитоплазмою та невеликим периферично розташованим ядром.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Автори заявляють, що всі дослідження проведено з дотриманням принципів біоетики та норм гуманного ставлення до тварин. Клінічні маніпуляції виконували відповідно до вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV). Усі процедури (відбір крові, біопсія, хірургічне втручання) здійснювали виключно за клінічними показаннями. Власники всіх 37 собак надали письмову інформовану згоду на проведення діагностики,

лікування та використання отриманого біоматеріалу в наукових цілях. Під час маніпуляцій забезпечували належний догляд і мінімізацію больових факторів.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання ШІ та технологій на основі ШІ

Автори заявляють, що не використовували штучний інтелект або технології на основі ШІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. Bolhova, L. S., Aleksieienko, O. I., & Ponomarenko, A. O. (2019). Histohichni tyipy pukhlyn zhyrovoy tkanyny ta yikh kharakterystyka [Histological types of adipose tissue tumors and their characteristics]. In *Suchasni pidkhydy do diahnozyky ta lykuvannya zloiakisnykh zakhvoriuvan: Materialy naukovo-praktychnoi konferentsii (dlia molodykh vchenykh)* (p. 58). *Klinichna Onkologiya*, 9(1). <https://doi.org/10.32471/clinicaloncology.2663-466X.38.22424> (in Ukrainian)
2. Avallone, G., Pellegrino, V., Muscatello, L. V., Sarli, G., & Roccabianca, P. (2017). Spindle cell lipoma in dogs. *Veterinary Pathology*, 54(5), 792–794. <https://doi.org/10.1177/0300985817707022>
3. Bailhache, E., Nguyen, P., Krempf, M., Siliart, B., Magot, T., & Ouguerram, K. (2003). Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. *Metabolism*, 52(5), 559–564. <https://doi.org/10.1053/meta.2003.50110>
4. Barrantes Murillo, D. F., Berrocal, A., Bell, C., Rissi, D. R., Craig, L. E., Graham, E. A., Brinker, E. J., & Negrão Watanabe, T. T. (2024). Oral fibrolipoma in dogs: Retrospective case series study and comparative review. *Veterinary Pathology*, 62(1), 31–36. <https://doi.org/10.1177/03009858241273238>
5. Hernández, C. G., López, M. F., Sánchez, R. M., & Rodríguez, A. L. (2024). Lipid metabolism in obese vs. lean dogs and clinical implications. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, 8(12), 68–72. <https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v8.i12a.7342>
6. Ginsberg, H. N., Zhang, Y.-L., & Hernandez-Ono, A. (2005). Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Archives of Medical Research*, 36(3), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.01.005>
7. Glueck, C. J., Khan, N. A., Umar, M., Uppal, M. S., Ahmed, W., Morrison, J. A., Goldenberg, N., & Wang, P. (2009). Insulin resistance and triglycerides. *Journal of Investigative Medicine*, 57(8), 874–881. <https://doi.org/10.2310/jim.0b013e3181bca9d2>
8. Gomez-Fernandez-Blanco, C., Peeters, D., Farnir, F., Höglund, K., Gouni, V., Wiberg, M., Lundgren Willesén, J., Hanås, S., McEntee, K., Tired, L., Häggström, J., Lohi, H., Chetboul, V., Fredholm, M., Seppälä, E., Lequarré, A.-S., German, A. J., & Merveille, A.-C. (2024). Fasting triglyceride concentrations are associated with markers of lipid metabolism and glucose homeostasis in healthy, non-obese dogs in lean and overweight condition. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1406322. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1406322>
9. Habermaass, V., Takami, Y., Izawa, T., Abramo, F., Biolatti, C., & Marchetti, V. (2025). Lipid dysmetabolism in canine chronic liver disease: Relationship between clinical, histological and immunohistochemical features. *Veterinary Sciences*, 12(3), 220. <https://doi.org/10.3390/vetsci12030220>

10. Hendrick, M. J. (2017). Mesenchymal tumors of the skin and soft tissues. In D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (5th ed., pp. 158–159). Wiley-Blackwell.
11. Hendrick, M. J. (2016). Mesenchymal tumors of the skin and soft tissues. In D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (5th ed., pp. 142–175). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781119181200.ch5>
12. Kim, T.-U., Huh, C., Yim, J.-H., Kim, W. J., Baek, S.-M., & Park, J.-K. (2025). Lingual liposarcoma transitioning from an infiltrative lipoma in a dog. *Journal of Comparative Pathology*, 221, 31–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2025.07.008>
13. Kim, T.-W., Kang, M.-H., & Park, H.-M. (2025). Lipid metabolism alterations in hyperlipidemic dogs with biliary tract or endocrine diseases. *Animals*, 15(2), 256. <https://doi.org/10.3390/ani15020256>
14. Li, K., Xiao, X., Li, Y., Lu, S., Zi, J., Sun, X., Xu, J., Liu, H.-Y., Li, X., Song, T., & Cai, D. (2024). Insights into the interplay between gut microbiota and lipid metabolism in the obesity management of canines and felines. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 15(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s40104-024-01073-w>
15. Liang, Z., Zang, Y., Jing, Z., Zhang, Y., Cao, H., & Zhou, H. (2021). Hypopharyngeal spindle cell lipoma. *Medicine*, 100(18), e25782. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000025782>
16. Osawa, T., Miura, M., Yamagishi, N., Kim, D., Fukuda, N., Fukuoka, H., Sasaki, J., & Goryo, M. (2011). Fibrolipoma of a cryptorchid testis in a young bull. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(9), 1253–1255. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0122>
17. McKenzie, B., Peloquin, M., Tovar, A., Graves, J. L., Ratcliff, E., Tucker, K., Vo, K., Greenwood, K., Halioua-Haubold, C.-L., & Juarez-Salinas, D. (2024). Feeding dogs a high-fat diet induces metabolic changes similar to natural aging, including dyslipidemia, hyperinsulinemia, and peripheral insulin resistance. *American Journal of Veterinary Research*, 85(6), ajvr.23.11.0253. <https://doi.org/10.2460/ajvr.23.11.0253>
18. Mendes, R. E., Laovechprasit, W., Schneider, S. M., & Rissi, D. R. (2025). Cutaneous and subcutaneous fibrolipomas in 236 dogs, 2017–2024: a retrospective case series and comparative review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 37(4), 684–688. <https://doi.org/10.1177/10406387251328600>
19. Meuten, D. J., & Munday, C. S. (Eds.). (2026). *Tumors in domestic animals* (6th ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119903109>
20. Misdorp, W. (2007). The impact of pathology on the study and treatment of cancer. In S. J. Withrow & D. M. Vail (Eds.), *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology* (4th ed., pp. 12–26). Saunders Elsevier.
21. Montgomery, P., Earley, N., Haugland, S., Cronin, A., & Hall, J. (2025). Diagnosis and surgical management of a pharyngeal fibrolipoma in a Jack Russell terrier. *Veterinary Record Case Reports*, 13(2), e70018. <https://doi.org/10.1002/vrc2.70018>
22. O'Neill, D. G., Corah, C. H., Church, D. B., Brodbelt, D. C., & Rutherford, L. (2018). Lipoma in dogs under primary veterinary care in the UK: prevalence and breed associations. *Canine Genetics and Epidemiology*, 5(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40575-018-0065-9>
23. Osto, M., & Lutz, T. A. (2015). Translational value of animal models of obesity – Focus on dogs and cats. *European Journal of Pharmacology*, 759, 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.036>
24. Palić, J., Saey, V., van der Lugt, J., Baumgärtner, W., & Hülskötter, K. (2023). Cytologic, histopathologic, and immunohistochemical features of keloidal fibroma in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 52(4), 676–680. <https://doi.org/10.1111/vcp.13282>
25. Pazdzior-Czapula, K., Mikiewicz, M., Gesek, M., Zwolinski, C., & Otrócka-Domagala, I. (2015). Diagnostic immunohistochemistry for canine cutaneous round cell tumours – retrospective analysis of 60 cases. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 57(3), 146–154. <https://doi.org/10.5603/fhc.a2019.0016>
26. Ramirez, G. A., Altimira, J., Garcia, B., & Vilafranca, M. (2010). Chondro-osteoblastic metaplasia in canine benign cutaneous lipomas. *Journal of Comparative Pathology*, 142(1), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.06.007>
27. Raskin, R. E., & Meyer, D. J. (Eds.). (2016). Cutaneous and subcutaneous masses. In R. E. Raskin & D. J. Meyer (Eds.), *Canine and feline cytology: A color atlas and interpretation guide* (3rd ed., pp. 210–225). Elsevier Saunders
28. Rissi, D. R., & Oliveira, F. N. (2022). Review of diagnostic histologic features of cutaneous round cell neoplasms in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 34(5), 769–779. <https://doi.org/10.1177/10406387221100209>
29. Santos, M., Marcos, R., Oliveira, J., & Avallone, G. (2025). Cytology and differential diagnosis of canine spindle cell lipoma. *Veterinary Medicine and Science*, 11(6), e70587. <https://doi.org/10.1002/vms3.70587>
30. Vincken, G., Bergamino, C., Barthelemy, N., Ramery, E., & Bolen, G. (2025). Intra-articular lipomatous lesion in the stifle in a dog. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 94(1), 27–32. <https://doi.org/10.21825/vdt.94077>
31. Wangsiricharoen, S., Wakely, P. E., Siddiqui, M. T., & Ali, S. Z. (2021). Cytopathology of chondromyxoid fibroma: a case series and review of the literature. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 10(4), 366–381. <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2021.04.001>
32. Bookbinder, L., Finno, C. J., Firshman, A. M., Katzman, S. A., Burns, E., Peterson, J., Dahlgren, A., Ming-Whitfield, B., Glessner, S., Borer-Matsui, A., & Valberg, S. J. (2019). Impact of alpha-tocopherol deficiency and supplementation on sacrocaudalis and gluteal muscle fiber histopathology and morphology in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(6), 2770–2779. <https://doi.org/10.1111/jvim.15643>
33. Xu, H., Piao, X., Zhang, H., Cao, L., Zhang, H., Chen, Z., Hu, X., Jiao, Y., Peng, Y., & Zheng, X. (2026). Fibrolipoma in the upper eyelid of a canine: First case report. *Veterinary Ophthalmology*, 29(2), 1–6. <https://doi.org/10.1111/vop.70127>
34. Zaika, S., Komlyk, A., & Sydorenko, B. (2023). Histolohichna kharakterystyka adenokartsynomy molochnoi zalozy u sobak [Histological characteristics of mammary adenocarcinoma in dogs]. *Scientific Collection «InterConf+»*, (32(151)), 534–540. <https://doi.org/10.51582/interconf.19-20.04.2023.057> (in Ukrainian)

ORCID

- | | |
|--|---|
| T. Budnik  | https://orcid.org/0000-0002-9754-3938 |
| S. Huralaska  | https://orcid.org/0000-0001-7383-1989 |
| O. Pinskyi  | https://orcid.org/0000-0002-1978-5261 |
| S. Zaika  | https://orcid.org/0000-0002-9863-0988 |
| Z. Khomenko  | https://orcid.org/0000-0002-2325-4586 |



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Histopathological study in mice infected experimentally with *Aspergillus fumigatus*

E. A.-A. Azzawi✉

Article info

Correspondence Author

E. A.-A. Azzawi

E-mail:

eman.a.a.vet@uodiyala.edu.iq

College of Veterinary
Medicine, University of
Diyala,
Al-Muradia, Old Baghdad-
Baqubah Road, Baqubah,
32001, Diyala, Iraq

Citation: Azzawi, E. A.-A. (2026). Histopathological study in mice infected experimentally with *Aspergillus fumigatus*. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 123–129. doi: 10.31210/spi2026.29.02.18

Aspergillosis is a highly prevalent and dangerous infectious zoonotic disease that poses a significant threat to public health and animal welfare globally. *Aspergillus fumigatus* is an opportunistic fungal pathogen that disseminates efficiently through contaminated water, agricultural soil, and decaying organic matter. This research aims to characterize the acute toxic impacts and subsequent pathomorphological alterations induced by *Aspergillus fumigatus* within the liver and small intestine of laboratory mice. A total of 30 mice, aged 10–12 weeks and weighing approximately 25 g, were acclimated for two weeks and then randomly divided into an infected group and a control group, each containing 15 animals. Group 1 served as the untreated control, while Group 2 was challenged with a single intraperitoneal injection of *Aspergillus fumigatus* spore suspension at a concentration of 2×10^7 cells/ml with a dose of 20 μ l per mouse. Following the experimental period, all animals were humanely euthanized for subsequent visceral tissue collection. Detailed pathomorphological analysis of the liver from the infected group revealed prominent lymphocyte cuffing adjacent to the hepatic blood vessels, severe hepatocellular necrosis, dilation of the central vein, hydropic cellular swelling, and vascular congestion. Furthermore, histopathological examination of the small intestine documented severe mucosal barrier degradation, including villous epithelial hyperplasia, extensive mononuclear cell infiltration within the mucosa and submucosa, diffuse tissue edema, advanced villous blunting, and localized fibrosis. In conclusion, the obtained results demonstrate that *Aspergillus fumigatus* and its associated mycotoxins induce profound structural tissue ruin in vital internal organs. Given the ubiquitous environmental distribution of the pathogen, these findings highlight its high virulence, its capacity to breach local epithelial protective barriers, and its ability to trigger severe acute inflammation, resulting in profound pathomorphological alterations in essential internal organ systems.

Keywords: Aspergillosis, *Aspergillus fumigatus*, Histopathological lesions, Liver pathology, Mycotoxins, Intestinal damage.

Патоморфологічне дослідження мишей за експериментального зараження *Aspergillus fumigatus*

E. A.-A. Аззаві

Факультет ветеринарної
медицини, Університет
Діяла,
м. Баакуба, Ірак

Аспергіллез є надзвичайно поширеним і небезпечним інфекційним зоонозним захворюванням, яке становить значну загрозу для громадського здоров'я та благополуччя тварин у всьому світі. *Aspergillus fumigatus* є опортуністичним грибовим патогеном, який інтенсивно поширюється через забруднену воду, ґрунти та гниючу органічну речовину. Це дослідження мало на меті охарактеризувати гострі токсичні ефекти та патоморфологічні зміни, спричинені *Aspergillus fumigatus* у печінці та тонкому кишечнику лабораторних мишей. Загалом 30 мишей (віком 10–12 тижнів і вагою приблизно 25 г) пройшли двотижневу акліматизацію, після чого їх випадковим чином розділили на інфіковану та контрольну групи, по 15 тварин у кожній. Група 1 слугувала необробленим контролем, тоді як Групі 2 вводили одноразову внутрішньочеревну ін'єкцію суспензії спор *A. fumigatus* у концентрації 2×10^7 клітин/мл у дозі 20 мкл на мишу. Після завершення експериментального періоду всі тварини були гуманно евтаназовані для подальшого відбору зразків вісцеральних тканин. Детальний патоморфологічний аналіз печінки інфікованої групи виявив периваскулярні лімфocитарні муфти кровоносних судин печінки, вогнищевий некроз гепатоцитів, розширення центральної вени, гідропічне набрякання клітин і судинне повнокрів'я. Крім того, гістопатологічне дослідження тонкого кишечника зафіксувало глибоку деструкцію слизового бар'єра, включаючи гіперплазію епітелію ворсинок, дифузну інфільтрацію мононуклеарними клітинами слизової та підслизової оболонок, набряк тканин, виражене згладжування ворсинок і локальний фіброз. У підсумку, отримані результати демонструють, що *Aspergillus fumigatus* та пов'язані з ним мікотоксини спричиняють глибоке руйнування структури тканин життєво важливих внутрішніх органів. Враховуючи повсюдне поширення патогену в навколишньому середовищі, ці висновки підкреслюють його високу вірулентність, здатність долати місцеві захисні епітеліальні бар'єри та викликати важке гостре запалення, що призводить до глибоких патоморфологічних змін у внутрішніх органах макроорганізму.

Ключові слова: аспергіллез, *Aspergillus fumigatus*, гістопатологічні ураження, патологія печінки, мікотоксини, ураження кишечника.



Бібліографічний опис для цитування: Аззаві Е. А.-А. Патоморфологічне дослідження мишей за експериментального зараження *Aspergillus fumigatus*. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 123–129.

Introduction

Both fungi and yeasts can cause a wide range of serious infections, varying from minor allergies and localized mucosal canal infections to potentially lethal systemic mycoses. The primary driver of the increasing prevalence of fungal infections is the growing population of immunocompromised individuals, such as cancer and HIV/AIDS patients [1]. Numerous opportunistic fungal infections and mycoses include candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and mucormycosis [2].

Aspergillus spp. is one of the most common and earliest documented agents of the fungal kingdom, first described in 1729 by the scientist Micheli. Throughout the 20th century, numerous studies categorized the genus *Aspergillus* into more than 180 species. *Aspergillus* species are filamentous saprophytic fungi that can colonize and infect living hosts, including insects, plants, mammals, and birds. These agents are ubiquitous in the soil, where they thrive as saprophytes [3]. *Aspergillus* induces a broad spectrum of pathologies, ranging from saprophytic colonization of the bronchial tree to rapidly invasive and diffuse infections.

Aspergillus fumigatus is considered the most prevalent pathogenic species in both humans and animals. As a saprotrophic fungus, it survives vegetatively on decaying organic matter in the soil and disseminates via asexual sporulation [4,5]. This fungus can withstand high temperatures (exceeding 50°C) typically found in decomposing plant material. The fungus produces a massive amount of airborne asexual spores [6]. Consequently, these fungi pose a severe clinical risk, inducing conditions from allergic reactions and chronic infections to highly invasive aspergillosis in both humans and animals [4].

Fungal genera such as *Penicillium* and *Aspergillus* germinate, develop, and produce mycotoxins at humidity levels of 80–90 % and 80 %, respectively [7]. However, environmental conditions that stimulate fungal vegetative growth do not always trigger mycotoxin production. Generally, temperatures between 25–30°C, water activity above 0.78, and relative humidity ranging from 88 % to 95 % represent the most favorable conditions for fungal and yeast growth, as well as subsequent mycotoxin synthesis [8].

The aim of the study

This research aims to characterize the acute toxic impacts and subsequent pathomorphological alterations induced by *Aspergillus fumigatus* within the liver and small intestine of laboratory mice.

Materials and methods

Isolation and identification of *Aspergillus fumigatus*

A total of 40 nasal swabs were collected from dogs with respiratory diseases in the Diyala Governorate. The research samples were stored in sterile tubes containing fresh transport media and maintained at 4°C

in ice containers until cultivation. In the laboratory, the samples were inoculated onto Sabouraud Dextrose Agar and incubated at 37°C for 7 days.

Preparation and standardization of inoculum

To prepare the fungal inoculum for animal infection, conidia were obtained by flooding the agar plates with 20 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1 % Tween-80. The resulting suspension was filtered through two layers of sterile gauze to remove any remaining hyphae fragments and maintained at 4°C [9].

To standardize the concentration of this spore suspension, a McFarland standard solution No. 0.5 was prepared as a reference by mixing 9.95 ml of 1 % sulfuric acid with 0.05 ml of 1 % barium chloride in a sealed tube [10]. The density of the filtered fungal suspension was then adjusted according to this McFarland standard to achieve the precise target concentration of 2×10^7 cells/ml, which was required for the subsequent experimental challenge.

Experimental animals

A total of 30 mice, aged 10–12 weeks and weighing approximately 25 g, were acclimated for two weeks and then randomly divided into an infected group and a control group, each containing 15 mice.

Group 1: control mice (untreated).

Group 2: mice infected with *Aspergillus fumigatus* at a concentration of 2×10^7 cells/ml, administered via a single intraperitoneal injection at a dose of 20 µl per mouse, following the protocol described by Allawi [11].

At the end of the experimental post-infection period, all mice from both groups were humanely euthanized in strict accordance with international bioethical guidelines for the care and use of laboratory animals to minimize suffering, after which tissues were immediately harvested for further laboratory investigation.

Histopathological Study

Liver and intestine samples were collected and fixed in a 10 % formaldehyde solution to preserve the tissues in proper condition. The specimens were then processed routinely using an automated tissue processor (Histokinette) according to standard methods [12].

Results and discussion

Liver histopathology analysis

Histological examination of the liver sections from the control group (untreated mice, G1) demonstrated no significant pathological changes, as the tissue exhibited a well-preserved architecture with normal hepatocytes and clear sinusoids, which can be observed in **Fig. 1**.

The hepatic parenchyma displays normal histological features characteristic of healthy murine tissue. The polyhedral hepatocytes are organized in neat radiating cords with distinct, centrally located spherical nuclei. The spaces between the cell cords, representing the hepatic sinusoids, are completely clear, showing no signs of congestion, endothelial damage, or cellular infiltration.

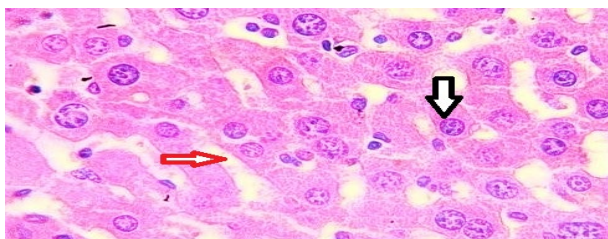


Fig. 1. Histological section of the liver from the control group (G1) showing normal hepatocytes (indicated by the white-and-black arrow) and intact sinusoids (indicated by the red arrow). (H&E stain, 40×)

In stark contrast, the pathomorphological examination of the liver from mice infected with *Aspergillus fumigatus* (G2) revealed severe structural alterations characteristic of acute parenchymal injury, heavily marked by a dense accumulation of inflammatory cells around the expanded vascular wall, as clearly demonstrated in **Fig. 2**.

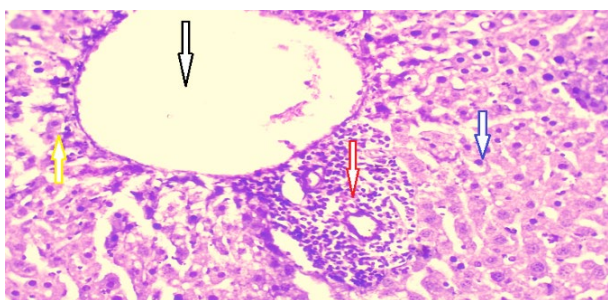


Fig. 2. Histopathological section of the liver from the infected group (G2) showing prominent lymphocytic cuffing around a blood vessel (red arrow), a severely dilated central vein (black arrow), acute cellular swelling of hepatocytes (blue arrow), and focal necrosis (yellow arrow). (H&E stain, 40×)

The microphotograph captures a severe acute inflammatory process within the hepatic tissue. The central vein is massively dilated and engorged, surrounded by a heavy peri-vascular sheath composed mostly of lymphoid cells (lymphocytic cuffing). The adjacent hepatocytes are severely altered, showing advanced hydropic degeneration or acute cellular swelling with a pale, vacuolated cytoplasm, along with focal zones of coagulative necrosis.

Further detailed assessment of the infected liver parenchyma (G2) confirmed the deep progression of the inflammatory response, specifically showing how a longitudinal section of the hepatic blood vessel becomes enveloped in a dense perivascular sheath, which is highlighted in **Fig. 3**.

The longitudinal cut of the vascular channel displays a severe form of non-suppurative hepatitis. The perivascular connective tissue is heavily infiltrated by mononuclear inflammatory cells. This aggressive infiltration extends directly into the nearby sinusoidal spaces, actively breaking up the hepatic cords and

causing widespread cellular dissolution, leaving behind ghost-like necrotic hepatocytes with fragmented or absent nuclei.

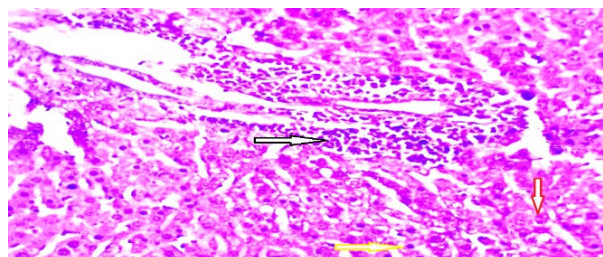


Fig. 3. Histopathological section of the liver from the infected group (G2) showing distinct lymphocytic cuffing around a longitudinal blood vessel (white arrow with black outline), diffuse mononuclear cell infiltration (yellow arrow), and necrotic hepatocytes (red arrow). (H&E stain, 40×)

The histopathological analysis of the liver from the infected group (G2) additionally demonstrated significant hemodynamic disturbances alongside advanced parenchymal damage, resulting in severe vascular congestion and microthrombi formation, as illustrated in **Fig. 4**.

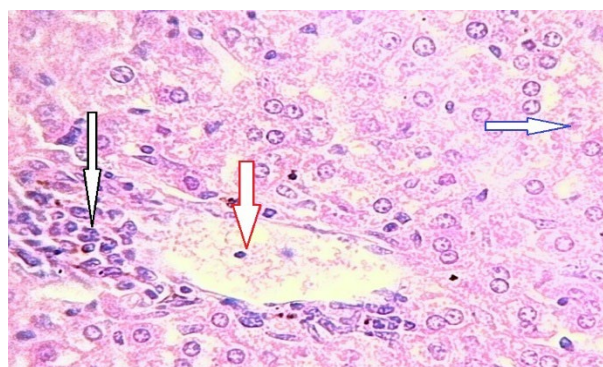


Fig. 4. Histopathological section of the liver from the infected group (G2) showing prominent lymphocyte cuffing around a blood vessel (white arrow), marked vascular congestion (red arrow), and a necrotic hepatocyte exhibiting nuclear dissolution (blue arrow). (H&E stain, 40×)

This region highlights the severe toxic and circulatory impacts of the fungal pathogen. The blood vessel lumen is heavily congested and filled with packed erythrocytes, indicating stasis. Persistent perivascular lymphocytic aggregates exert physical pressure on the hepatic architecture. The surrounding hepatocytes display terminal cellular damage, including advanced karyolysis (nuclear dissolution) and cellular shrinkage.

At a higher resolution, closer inspection of the infected liver parenchyma (G2) revealed localized cellular responses and small, well-defined focal aggregations of lymphocytes within the sinusoidal spaces away from the main vessel walls, as visualized in **Fig. 5**.

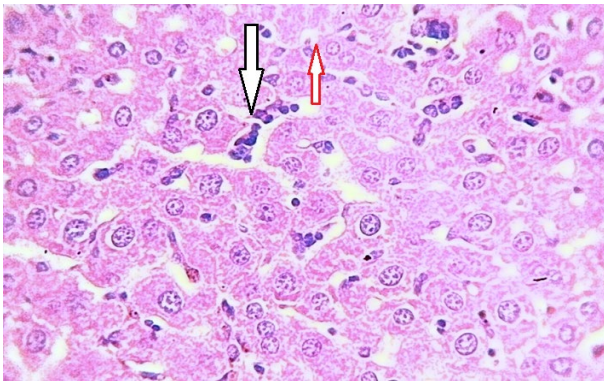


Fig. 5. Histopathological section of the liver from the infected group (G2) showing active nuclear division and slightly degenerated hepatocytes (red arrow), alongside a distinct focal aggregation of lymphocytes (white arrow). (H&E stain, 40×)

The microphotograph demonstrates a chronic-active cellular defense mechanism. A prominent focal cluster of lymphocytes is embedded directly within the hepatic cords. While many nearby cells show mild degenerative changes, there is clear evidence of nuclear division and binucleation among several hepatocytes, which represents a compensatory regenerative attempt by the liver tissue to overcome the destructive mycotoxins.

Intestine histopathology analysis

Histological examination of the intestinal sections from the control group (untreated mice, G1) demonstrated a completely normal and well-preserved tissue architecture, showing intact mucosal villi lined by a continuous epithelial layer, as shown in **Fig. 6**.

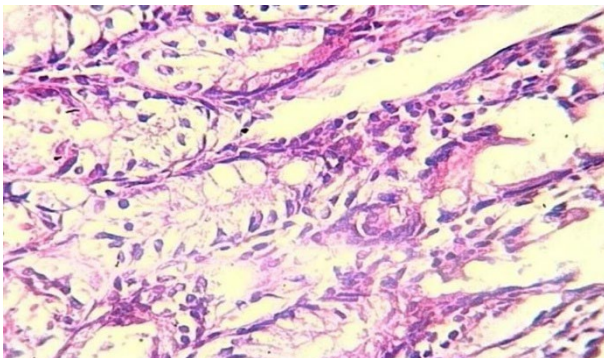


Fig. 6. Histological section of the intestine from the control group (G1) showing normal, intact architecture of the villi within the mucosal layer. (H&E stain, 40×)

The structural integrity of the small intestine is fully preserved. The finger-like intestinal villi project normally into the lumen, covered by a uniform layer of simple columnar epithelial cells with an intact brush border. The underlying lamina propria contains a normal, low density of resident immune cells, and no edema or vascular alterations are present in the submucosa.

On the contrary, the pathomorphological examination of the intestinal tissue from mice infected with *Aspergillus*

fumigatus (G2) revealed early structural degradation and a pronounced local inflammatory response, marked by distinct cellular hyperplasia of the villi, as seen in **Fig. 7**.

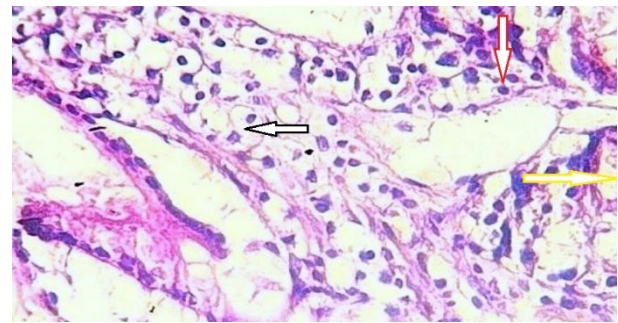


Fig. 7. Histopathological section of the intestine from the infected group (G2) showing prominent hyperplasia of the villi (white arrow with black outline), extensive mononuclear cell infiltration within the mucosa and submucosa (red arrow), and severe tissue edema (yellow arrow). (H&E stain, 40×)

The tissue responds to the fungal irritation with defensive remodeling. The epithelial layer of the villi displays noticeable hyperplasia, making the structures appear thickened. A heavy influx of mononuclear inflammatory cells is visible throughout the mucosa and submucosa. Furthermore, severe accumulation of fluid (edema) pushes the connective tissue fibers apart, widening the submucosal space.

With the continuous progression of the *Aspergillus fumigatus* infection, the intestinal mucosa (G2) displayed advanced structural lesions and acute vascular disturbances, which caused severe infiltration of the epithelial cells and localized hemorrhages, as documented in **Fig. 8**.

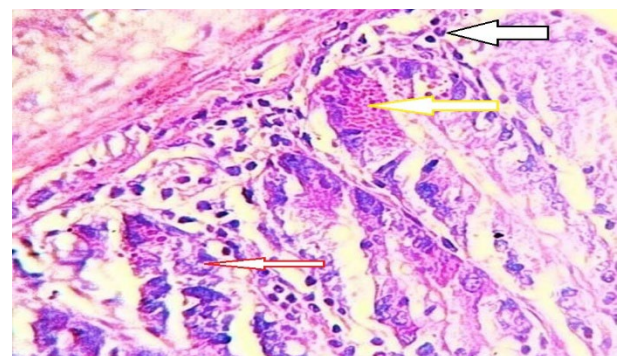


Fig. 8. Histopathological section of the intestine from the infected group (G2) showing mononuclear cell infiltration within the mucosal layer (white arrow), damaged and disrupted intestinal villi (red arrow), and widespread hemorrhage (yellow arrow). (H&E stain, 20×)

At a lower magnification, a wider zone of destruction is visible. The normal architecture of the mucosal surface is lost, showing severe mechanical damage, blunting, and fragmentation of the villi. Masses of mononuclear cells

infiltrate the mucosal sheet, and prominent patches of free red blood cells (hemorrhage) are scattered across the tissue, showing that the local capillary walls have been damaged by the infection.

In the deeper layers and prolonged stages of tissue injury, the intestinal wall of the infected group (G2) exhibited chronic structural remodeling and a significant proliferation of connective tissue elements within the submucosa, which is clearly illustrated in **Fig. 9**.

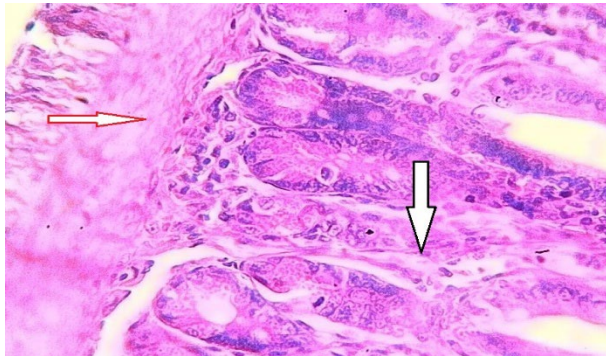


Fig. 9. Histopathological section of the intestine from the infected group (G2) showing advanced damage to the mucosal villi (white arrow with black outline) and areas of localized fibrosis within the tissue wall (red arrow).
(H&E stain, 40×)

The image illustrates a chronic pathological shift within the intestine. The mucosal villi are completely flattened and ruined. In response to this severe, long-term ulceration and inflammation, the tissue has activated fibroblastic pathways, resulting in an abnormal accumulation of collagen fibers (localized fibrosis) within the structural wall, which permanently alters intestinal function.

Detailed histopathological evaluation of the intestinal mucosa from the infected group (G2) finally highlighted significant cellular and functional adaptive responses, leading to widespread vacuolation and a massive increase in secretory structures, as captured in **Fig. 10**.

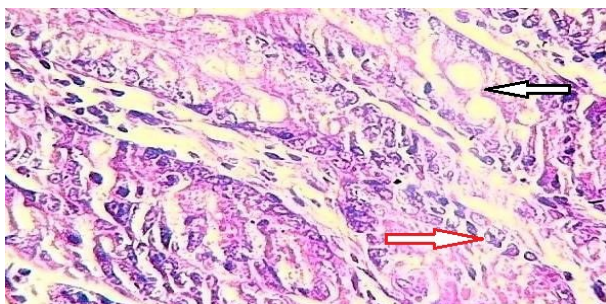


Fig. 10. Histopathological section of the intestine from the infected group (G2) showing prominent vacuolation of epithelial cells (red arrow) and a significant increase in number and size of mucus-secreting goblet cells (white arrow with black outline).
(H&E stain, 40×)

The high-power view reveals severe intracellular pathology and a hyper-secretory state. The columnar epithelial cells contain large clear spaces (vacuolation), showing a breakdown of fluid balance inside the cells. Concurrently, the tissue shows a massive increase in both the size and number of goblet cells (goblet cell hyperplasia). This represents an intense physiological effort by the intestine to produce excessive mucus to shield itself from *A. fumigatus* and its toxic metabolites.

Infection with *Aspergillus* species has been extensively documented in both humans and animals [13, 14]. This opportunistic genus comprises pathogens capable of inducing a broad spectrum of mycoses, ranging from hypersensitivity reactions to highly invasive and lethal systemic aspergillosis, heavily facilitated by its ubiquitous nature as an airborne filamentous fungus [15–17]. Previous studies evaluated the impacts of *Aspergillus fumigatus* via intranasal inoculation in mice, demonstrating that a common host could suffer from systemic aspergillosis [18–20]. The current research concentrated on the pathobiological activity of this fungal species across vital internal organs when administered via the intraperitoneal route in a murine model, serving as a complementary study to map the dissemination patterns of aspergillosis.

The liver represents the primary target organ in cases of mycotoxin poisoning, although other systemic organs may also be progressively affected [21]. Numerous studies have documented severe histopathological changes in hosts suffering from systemic aspergillosis [18]. The histopathological alterations observed in the liver tissue of mice exposed to *A. fumigatus* in this study included extensive mononuclear cell infiltration, central vein dilation, acute cellular swelling of hepatocytes, severe vascular congestion, hepatocellular degeneration, and necrosis. It has been reported that *A. fumigatus* produces a wide variety of extracellular metabolites, including organic acids and proteolytic proteins [22]. Consistent with our findings, previous research noted that liver damage following *A. fumigatus* infection includes focal hemorrhages, lymphocyte infiltration, and hepatocellular necrosis, particularly localized near the portal spaces [18].

Furthermore, historical histopathological analyses revealed dose-dependent degenerative changes within specific hepatic cells, confirming that profound liver degeneration takes place during fungal infection [23]. These changes are typically accompanied by the influx of inflammatory cells across numerous anatomical locations, hemorrhagic expansions, and marked congestion developments within both the portal and central veins [23]. It has been documented that such hepatocellular necrosis is directly triggered by the specific metabolic products and toxins synthesized by *Aspergillus* fungi [24]. For instance, it was observed that within 48 hours of *A. fumigatus* and *Aspergillus flavus* injection, hepatocytes undergo acute necrosis, developing into cumulative inflammation and exerting severe harmful impacts on the murine liver [25]. Pathogenic *Aspergillus* species produce an array of distinct toxins, including endotoxins, oxalic acid, gliotoxins, and heparin factors,

which collectively induce tissue necrosis and systemic immunosuppression [26].

Regarding the intestinal tract, it was indicated that mice infected intraperitoneally with *A. fumigatus* for more than two weeks displayed marked mononuclear cell (MNC) infiltration within the tissue matrix, alongside prominent epithelial cell hyperplasia in the intestine [27]. Conversely, some studies observed widespread fungal-induced damage within the mucosal layers and external linings, noting a significant reduction in the regions settled by goblet cells and a depletion of mucins following exposure to varying levels of *Aspergillus cristatum* [28].

Furthermore, exposure to *Aspergillus* toxins at a dose of 0.6 mg/kg generally induces generalized hyperemia across all intestinal segments, accompanied by localized individual hemorrhages, with the duodenum being more deeply affected compared to other segments [29]. Under these toxic conditions, portions of the villous epithelium undergo desquamation and are sloughed into the intestinal lumen; this cellular disintegration, desquamation, and basement membrane hypertrophy are strictly associated with pyknosis and karyolysis of the nuclei [29]. When the toxic dose is increased to 0.8 mg/kg, the intestinal destruction becomes significantly more severe, leading to advanced necrotic alterations within the intestinal villi [29], which aligns with the widespread mucosal hemorrhages documented across multiple studies [30].

All *Aspergillus* species are considered opportunistic agents, with *A. fumigatus* being the primary etiological driver of aspergillosis in both humans and animals, even though other species within the genus may be concurrently involved [31]. These pathogens trigger severe clinical manifestations when predisposing risk factors are present, such as immunodeficiency, physiological stress, and adverse environmental conditions, including poor ventilation, toxin exposure, dusty atmospheres, and inappropriate humidity or temperature levels [32]. Ultimately, the pathogenicity of *A. fumigatus* is driven by its specialized virulence factors. These are represented by specific components of its genetic architecture responsible for pathogenicity, alongside the active secretion of mycotoxins and proteolytic enzymes [33]. These mechanisms effectively enable the fungus to penetrate biological barriers and invade vital internal organs despite the microscopic size of its airborne spores [33].

Conclusions

In conclusion, this study demonstrates that *Aspergillus fumigatus* exhibits profound virulence and pathogenicity, inducing severe acute inflammatory and degenerative pathomorphological alterations within vital visceral systems. The experimental intraperitoneal challenge in a murine model establishes that the dissemination of fungal elements and their secondary mycotoxins triggers profound tissue damage, characterized by severe vascular congestion, leukocyte infiltration, and focal necrosis in the hepatic parenchyma, alongside extensive mucosal

degradation, villous blunting, localized fibrosis, and protective goblet cell hyperplasia in the small intestine. Ultimately, these findings highlight the significant public health risk posed by the ubiquitous environmental presence of *A. fumigatus*, underscoring its capacity to breach local epithelial barriers, suppress host tissue resistance, and cause multi-organ pathomorphological failure.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The author confirms that all experimental procedures and studies involving biological objects were planned and conducted in strict accordance with the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1986), Directive 2010/63/EU, national ethical norms, and international standards for the humane treatment of laboratory animals (NIH, ARRIVE). The research protocol and experimental scheme were officially reviewed and approved by the Bioethics Committee of the College of Veterinary Medicine, University of Diyala, Iraq (Protocol No. 50 dated 20/02/2026). To minimize animal stress, discomfort, and suffering, all handling, maintenance, inoculation, and subsequent tissue sampling procedures involving laboratory mice were executed in strict compliance with standard veterinary guidelines, recommendations of the American Veterinary Medical Association (AVMA), and current international principles of animal welfare.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The author states that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The author expresses gratitude to everyone who contributed to this research.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The author declares that no generative AI or AI-assisted technologies were used during the preparation, writing, translation, or language polishing of this manuscript. The final content was fully authored and reviewed by the researcher, who takes sole responsibility for the work.

References

1. Camilli, G., Blagojevic, M., Naglik, J. R., & Richardson, J. P. (2021). Programmed cell death: Central player in fungal infections. *Trends in Cell Biology*, 31(3), 179–196. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.11.005>
2. Seyedmousavi, S., de Hoog, G. S., Guillot, J., & Verweij, P. E. (Eds.). (2018). *Emerging and epizootic fungal infections in animals*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72093-7>
3. Nji, Q. N., Babalola, O. O., & Mwanza, M. (2023). Soil *Aspergillus* species, pathogenicity and control perspectives. *Journal of Fungi*, 9(7), 766. <https://doi.org/10.3390/jof9070766>
4. Latgé, J.-P., & Chamilos, G. (2019). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1), e00140-18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00140-18>

5. Tell, L. A., Burco, J. D., Woods, L., & Clemons, K. V. (2019). Aspergillosis in birds and mammals: Considerations for veterinary medicine. In *Recent developments in fungal diseases of laboratory animals* (pp. 49–72). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18586-2_4
6. Schoustra, S. E., Debets, A. J. M., Rijs, A. J. M. M., Zhang, J., Snelders, E., Leendertse, P. C., Melchers, W. J. G., Rietveld, A. G., Zwaan, B. J., & Verweij, P. E. (2019). Environmental hotspots for azole resistance selection of *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 25(7), 1347–1353. <https://doi.org/10.3201/eid2507.181625>
7. Mannaa, M., & Kim, K. D. (2017). Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Mycobiology*, 45(4), 240–254. <https://doi.org/10.5941/myco.2017.45.4.240>
8. Thanushree, M. P., Sailendri, D., Yoha, K. S., Moses, J. A., & Anandharamkrishnan, C. (2019). Mycotoxin contamination in food: An exposition on spices. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.010>
9. Su, H., Li, C., Wang, Y., Li, Y., Dong, L., Li, L., Zhu, J., Zhang, Q., Liu, G., Xu, J., & Zhu, M. (2019). Kinetic host defense of the mice infected with *Aspergillus fumigatus*. *Future Microbiology*, 14(8), 705–716. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0043>
10. Baron, E. J., Bennion, R., Thompson, J., Strong, C., Summanen, P., McTeague, M., & Finegold, S. M. (1992). A microbiological comparison between acute and complicated appendicitis. *Clinical Infectious Diseases*, 14(1), 227–231. <https://doi.org/10.1093/clinids/14.1.227>
11. Allawi, S. G. (2023). Effects of Solanum aculeastrum fruit extract on *Aspergillus fumigatus* load in lung tissue of mice [Master's thesis, University of Baghdad]. College of Veterinary Medicine.
12. Luna, L. G. (1968). *Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (3rd ed.). McGraw-Hill.
13. Latgé, J.-P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 310–350. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.2.310>
14. Hohl, T. M., & Feldmesser, M. (2007). *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic Cell*, 6(11), 1953–1963. <https://doi.org/10.1128/ec.00274-07>
15. Croft, C. A., Culibrk, L., Moore, M. M., & Tebbutt, S. J. (2016). Interactions of *Aspergillus fumigatus* conidia with airway epithelial cells: A critical review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 472. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00472>
16. Kalleda, N., Amich, J., Arslan, B., Poreddy, S., Mattenheimer, K., Mokhtari, Z., Einsele, H., Brock, M., Heinze, K. G., & Beilhack, A. (2016). Dynamic immune cell recruitment after murine pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection under different immunosuppressive regimens. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01107>
17. Laskaris, P., Atrouni, A., Calera, J. A., d'Enfert, C., Munier-Lehmann, H., Cavaillon, J.-M., Latgé, J.-P., & Ibrahim-Granet, O. (2016). Administration of zinc chelators improves survival of mice infected with *Aspergillus fumigatus* both in monotherapy and in combination with caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 5631–5639. <https://doi.org/10.1128/aac.00324-16>
18. Shafiq, S. A., & Al-Joofy, A. K. (2011). Histopathological and enzymatic study on the effect of *Aspergillus fumigatus* in mice. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*, 52(4), 480–483. <https://doi.org/10.32007/jfacmedbagdad.524962>
19. Hussain, H. T. (2017). Histopathological study on liver of mice during aspergillosis infection. *Iraqi Journal of Science*, 58(2A), 619–625. <https://ijs.uobaghdad.edu.iq/index.php/eijs/article/view/6082>
20. Iyalla, C. (2016). A review of the virulence factors of pathogenic fungi. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 18(1), 53–58. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v18i1.8>
21. Gaddawi, F. Y., Jarjees, N. A., Sultan, Safaa. M., & Irzoqy, M. E. (2022). Detection effect toxins produced by some types of fungi isolated from medicinal plants. *International Journal of Health Sciences*, 6(S1), 969–986. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6ns1.4843>
22. Frisvad, J. C., Rank, C., Nielsen, K. F., & Larsen, T. O. (2009). Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, 47(Suppl. 1), S53–S71. <https://doi.org/10.1080/13693780802307720>
23. Al-Maliki, S. J., Al-Ali, A. A., & Kathim, A. S. (2018). Effect of corticosteroids cortisol hormone [hydrocortisone] on the of the blood parameter in pregnant and non-pregnant laboratory females mice. *Journal of Histology and Cell Biology*, 1(1), 16–22.
24. Fadhil, L. A., Seddiq, S. H., Abid, S. A., & Abaas, N. F. (2017). Histological study of some isolation fungi from Iraq / Baghdad hospitals apparatus that affected in liver, kidney and testes in albino mice. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 6(12), 853–861. <https://doi.org/10.21275/art20178242>
25. Lian, X., Scott-Thomas, A., Lewis, J. G., Bhatia, M., & Chambers, S. T. (2024). Novel monoclonal antibodies 1D2 and 4E4 against *Aspergillus* glycoprotein antigens detect early invasive aspergillosis in mice. *Journal of Fungi*, 10(12), 832. <https://doi.org/10.3390/jof10120832>
26. Barathidasan, R., Singh, S. D., Saini, M., Sharma, A. K., & Dhama, K. (2013). The first case of angioinvasive pulmonary aspergillosis in a Himalayan griffon vulture (*Gyps himalayensis*). *Avian Biology Research*, 6(4), 302–306. <https://doi.org/10.3184/175815513x13818257354160>
27. Yassein, S. N. (2020). Comparative study of pathogenicity between *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium chrysogenum* in mice. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 51(Special), 894. <https://doi.org/10.36103/ijas.v51iSpecial.894>
28. Wang, X., Cheng, M., Liu, J., Guo, Y., Zhang, Y., Yuan, Y., & Yue, T. (2025). Live *Aspergillus cristatum* from Fuzhuan brick tea alleviates DSS-induced colitis by intestinal barrier restoration and suppressing NLRP3 signaling pathway regulation. *Foods*, 14(4), 549. <https://doi.org/10.3390/foods14040549>
29. Grozeva, N., Valchev, I., Hristov, Ts., Lazarov, L., & Nikolov, Y. (2015). Histopathological changes in small intestines of broiler chickens with experimental aflatoxicosis. *Agricultural Science and Technology*, 7(3), 313–318.
30. Ammann, H. M. (2003). Is indoor mold contamination a threat to health? Part two. *Journal of Environmental Health*, 66(2), 47–49.
31. Seyedmousavi, S., Guillot, J., Arné, P., de Hoog, G. S., Mouton, J. W., Melchers, W. J. G., & Verweij, P. E. (2015). *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: A global health concern with parallels to human disease. *Medical Mycology*, 53(8), 765–797. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv067>
32. Khosravi, A., & Mostofi, S. (2021). Disseminated pulmonary aspergillosis in a quail flock in Iran. *Journal of Zoonotic Diseases*, 5(4), 50–54.
33. Roeder, A., Kirschning, C. J., Rupec, R. A., Schaller, M., & Korting, H. C. (2004). Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends in Microbiology*, 12(1), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.11.003>

ORCID

E. A.-A. Azzawi 

<https://orcid.org/0009-0000-4390-207X>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Fatty acid composition of quail meat and eggs following dietary supplementation with a humic-based feed additive

M. Stankov✉

Article info

Correspondence Author
M. Stankov
E-mail:
putini.old@gmail.com

Odesa State Agrarian
University,
Panteleimonivs'ka Str., 13,
Odesa, 65012, Ukraine

Citation: Stankov, M. (2026). Fatty acid composition of quail meat and eggs following dietary supplementation with a humic-based feed additive. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 130–134. doi: 10.31210/spi2026.29.02.19

Humic acids are among the most effective natural chelating agents due to the wide variety of their functional groups. Compared with other inorganic adsorbents, particularly zeolites, their adsorption capacity is several times higher. In addition, their ability to bind heavy metals, such as cadmium and lead, increases with the atomic mass of the element. Humic acids also exhibit a high affinity for heterogeneous compounds, enabling them to eliminate or reduce the toxic effects of endogenous and exogenous toxins. The present study evaluated the effect of dietary supplementation with the humic substance-based feed additive Humivet and the veterinary preparation Chiktonikvet on the fatty acid composition of quail meat and eggs. Ninety-day-old Phoenix Golden quails were randomly assigned to three groups of 20 birds each. The first group served as the control and received no supplementation. Birds in the second group received 4 mL of Humivet per 1 L of drinking water, whereas birds in the third group received 2 mL of the oral veterinary preparation Chiktonikvet (batch V-022) per 1 L of drinking water. Both preparations were administered for 21 consecutive days. Dietary supplementation with Humivet and Chiktonikvet reduced the concentrations of several saturated fatty acids in quail meat, including arachidic, behenic, myristic, and heptadecanoic acids, compared with the control group. Additionally, the monounsaturated myristoleic acid was decreased. Supplementation with Chiktonikvet increased the contents of linoleic (20.7 ± 1.022 , $p < 0.05$), α -linolenic (0.42 ± 0.021), and γ -linolenic (0.86 ± 0.042) acids compared with the control. The concentrations of 18 fatty acids were also determined in quail eggs following dietary supplementation with Humivet and Chiktonikvet. Eggs from birds receiving Humivet contained the highest levels of linoleic acid ($p < 0.05$), oleic acid (49.0 ± 2.438 %, $p < 0.05$), and docosahexaenoic acid (0.30 ± 0.014 %). The obtained results demonstrate that supplementation of quail diets with the humic substance-based feed additive Humivet at a dose of 4 mL/L of drinking water significantly ($p < 0.05$) decreased the proportion of saturated fatty acids and increased the proportion of unsaturated fatty acids in meat. In eggs, Humivet supplementation significantly ($p < 0.05$) increased the proportions of linoleic and oleic acids.

Keywords: Humivet, Chiktonikvet, saturated fatty acids, unsaturated fatty acids, quails.

Жи́рно́кислотний склад м'яса та яєць перепелів за застосування кормової добавки на основі гумінових речовин

М. М. Станков

Одеський державний
аграрний університет,
м. Одеса, Україна

Гумінові кислоти, завдяки широкому спектру функціональних груп, належать до високоефективних природних хелатуючих агентів. Порівняно з іншими неорганічними адсорбентами, зокрема цеолітами, їхня адсорбційна здатність є у кілька разів вищою. Крім того, здатність цих сполук зв'язувати важкі метали (як-от кадмій і свинець) посилюється відповідно до зростання атомної маси елементів. Гумінові кислоти також характеризуються високими адсорбційними властивостями щодо гетерогенних сполук, що дозволяє мінімізувати або повністю усувати токсичний вплив ендогенних та екзогенних токсинів. У цьому дослідженні оцінювали вплив збагачення раціону кормовою добавкою на основі речовин гумінової природи «Гумівет» та препаратом «Чиктоніквет» на жирнокислотний склад м'яса та яєць перепелів. До експерименту було залучено 90-добових перепелів породи «Фенікс золотистий». Птицю поділили на три групи (по 20 голів у кожній): перша група (контрольна) не отримувала дослідних добавок; птиці другої групи з питною водою задавали добавку «Гумівет» у дозі 4 мл/л; третьої групи – 2 мл ветеринарного препарату для перорального застосування «Чиктоніквет» (серія V-022) на 1 літр води. Препарати застосовували впродовж 21 доби. Установлено, що збагачення раціону перепелів добавками «Гумівет» та «Чиктоніквет» сприяло зниженню вмісту насичених жирних кислот у м'ясі (зокрема арахідової, бегенової, міристинової та гептадеканої) порівняно з контролем, а також призвело до зменшення кількості мононенасиченої міристолеїнової кислоти. За включення до раціону препарату «Чиктоніквет» зафіксовано збільшення вмісту лінолевої ($20,7 \pm 1,022$ %, $p < 0,05$), α -ліноленої ($0,42 \pm 0,021$ %) та γ -ліноленої ($0,86 \pm 0,042$ %) кислот порівняно з контрольною групою. Також було визначено вміст 18 жирних кислот у яйцях перепелів. Установлено, що у групі, яка отримувала добавку «Гумівет», відзначено найвищий у яйцях вміст лінолевої жирної кислоти ($p < 0,05$), олеїнової ($49,0 \pm 2,438$ %, $p < 0,05$) та докозагексаєнової ($0,30 \pm 0,014$ %) кислот. Отримані результати свідчать, що додавання до раціону перепелів кормової добавки гумінової природи «Гумівет» у дозі 4 мл на 1 літр питної води достовірно ($p < 0,05$) зменшувало вміст у м'ясі насичених жирних кислот та збільшувало вміст ненасичених жирних кислот. Жирнокислотний склад яєць за збагачення раціону добавкою «Гумівет» характеризувався достовірно ($p < 0,05$) вищим відсотком вмісту лінолевої та олеїнової кислот.

Ключові слова: Гумівет, Чиктоніквет, насичені жирні кислоти, ненасичені жирні кислоти, перепілки.



Бібліографічний опис для цитування: Станков М. М. Жи́рно́кислотний склад м'яса та яєць перепелів за застосування кормової добавки на основі гумінових речовин. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 130–134.

Introduction

The chemical structure of humic acids (HAs) has not yet been fully elucidated. They contain a wide range of functional groups, including carboxyl, phenolic, carbonyl, hydroxyl, amino, amide, and aliphatic groups. Owing to their structural diversity, humic acids have numerous agricultural applications. They facilitate the transport of micronutrients from soil to plants, improve soil water retention, and stimulate the growth of soil microorganisms. Their ability to form chelate complexes with trace elements and enhance nutrient uptake by plants has also been utilized in crop production and plant breeding [25].

Due to the diversity of their functional groups, humic acids are among the most effective naturally occurring chelating agents. Compared with inorganic adsorbents such as zeolites, their adsorption capacity is several times greater. Their ability to bind heavy metals, including cadmium and lead, also increases with increasing atomic mass [9]. In addition, humic acids effectively adsorb heterogeneous compounds, thereby reducing or eliminating the toxic effects of endogenous and exogenous toxins [6, 24].

The use of humic substances in poultry nutrition has produced promising results. Dietary supplementation with humic substances has shown improvements in feed conversion efficiency and an increase in the final body weight of broiler chickens, although statistically significant differences have not always been observed. Nevertheless, an average increase of 70–90 g in the final body weight of a single bird represents a substantial economic advantage under commercial production conditions, particularly in large flocks [15]. Carcass yield and the yield of individual carcass cuts are important indicators of poultry production efficiency. Positive effects of humic acids on carcass yield have been reported at dietary inclusion levels ranging from 0.25 % to 1.0 %, with the highest carcass yield achieved at a supplementation level of 1 %. Broiler chickens receiving diets containing 1% humic acids also showed significantly higher breast and thigh muscle yields than birds in the control group [12].

During the last decade, humic substances have been extensively investigated as feed additives. Most studies have focused on growth performance, their potential as alternatives to antibiotic growth promoters, improvements in broiler health, and the reduction of antibiotic use [18, 19]. In contrast, considerably less information is available regarding their effects on meat quality [8, 20]. Japanese quails (*Coturnix japonica*) possess several production advantages, including small body size, rapid growth, high productivity, and relatively low production costs, making them suitable for both intensive commercial production and small-scale farming systems [5].

Currently, only limited information is available regarding the effects of humic acids used as feed additives on the fatty acid composition of quail meat and eggs. Therefore, this study was undertaken to investigate the influence of dietary supplementation with humic substances on the fatty acid composition of quail meat and eggs.

The aim of the study

The aim of this study was to determine the fatty acid composition of quail meat and eggs following dietary supplementation with a feed additive based on humic substances.

Materials and methods

The oral feed additive Humivet was prepared using brown coal from the Cherkasy deposit (Ukraine) as the raw material. A sodium humate solution containing 4 % humic acids was obtained [1]. The resulting feed additive had a density of 1.06 g/cm³ and a pH of 7.2.

The experiment involved 90-day-old Phoenix Golden quails. The birds were randomly divided into three groups of 20 birds each. The first group served as the control and received no feed additive. Birds in the second group received 4 mL of Humivet per 1 L of drinking water. Birds in the third group received 2 mL of the oral veterinary preparation Chiktonikvet (batch V-022) per 1 L of drinking water. Both preparations were administered for 21 consecutive days.

At the end of the supplementation period, the birds were humanely slaughtered in accordance with the Requirements for Ensuring Animal Welfare During Slaughter and Killing (Order of the Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine No. 628 dated August 29, 2022) [4], were humanely slaughtered. Five carcasses from each experimental group were collected and transported to the laboratory. In addition, five eggs were collected from each group. All samples were delivered to the laboratory within 24 h under appropriate transportation conditions.

The analyses were carried out at the Chemical and Toxicological Department of the State Scientific Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Expertise. The fatty acid composition of meat and eggs was determined according to DSTU ISO 5509:2002 [2] (preparation of fatty acid methyl esters) and DSTU ISO 5508:2001 [3] (gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters in animal and vegetable fats and oils).

Statistical analysis was performed using OpenEpi software (Dean AG, version 3.01). Differences between the corresponding means were considered statistically significant at ($p < 0.05$).

Results and discussion

Since poultry have only a limited capacity to elongate and desaturate long-chain fatty acids, the fatty acid profile of muscle tissue largely reflects the composition of the diet. The fatty acid composition of quail meat from the experimental and control groups is presented in *Table 1*.

Dietary supplementation with Humivet and Chiktonikvet reduced the concentrations of several saturated fatty acids in quail meat, including arachidic, behenic, myristic, and heptadecanoic acids, compared with the control group.

Table 1

Fatty acid composition of quail meat following dietary supplementation with Humivet and Chiktonikvet (%)

Fatty acid	Group I (Control)	Group II (Humivet)	Group III (Chiktonikvet)
Arachidic	0.10±0.005	0.07±0.0035	0.08±0.004
Behenic	0.12±0.006	0.02±0.001	0.04±0.002
Lauric	0.02±0.001	0.04±0.002	0.04±0.002
Linoleic	18.4±0.907	19.9±0.994*	20.7±1.022*
Myristic	0.74±0.038	0.72±0.038	0.69±0.036
Myristoleic	0.24±0.012	0.13±0.006	0.19±0.010
Oleic	44.08±2.195	45.3±2.256*	44.08±2.195
Palmitic	19.5±0.990	20.22±1.010	19.76±1.005
Palmitoleic	10.2±0.513	6.73±0.322	8.36±0.422
Stearic	3.44±0.172	5.12±0.256	3.77±0.189
Pentadecanoic	0.10±0.005	0.09±0.005	0.18±0.009
Heptadecanoic	0.37±0.019	0.12±0.005	0.30±0.015
Heptadecenoic	0.05±0.003	0.08±0.004	0.08±0.004
α-Linolenic	0.36±0.018	0.59±0.029	0.42±0.021
γ-Linolenic	0.73±0.036	0.96±0.042*	0.86±0.042
Eicosenoic	0.16±0.002	0.16±0.009	0.18±0.009
Eicosadienoic	0.04±0.002	0.10±0.003	0.06±0.003
cis-8,11,14-Eicosatrienoic	0.20±0.010	0.41±0.009*	0.19±0.009

Note: * p<0.05 compared with the control group.

More specifically, the content of arachidic acid decreased by 0.03 % in Group II and by 0.02 % in Group III relative to the control. The concentration of myristic acid decreased by 0.02 % and 0.05 %, respectively, while heptadecanoic acid decreased by 0.25 % and 0.07 %. Additionally, the monounsaturated myristoleic acid decreased by 0.12 % and 0.05 %, respectively. In contrast, stearic acid, which also belongs to the saturated fatty acids, was present at a higher concentration in the supplemented groups. Its content increased by 1.68 % (p<0.05) in Group II and by 0.33 % in Group III compared with the control.

Adding Humivet increased the proportion of several unsaturated fatty acids in quail meat relative to the control group. The contents of oleic acid increased by 1.22 % (p<0.05), γ-linolenic acid by 0.23 % (p<0.05), eicosadienoic acid by 0.06 %, and cis-8,11,14-eicosatrienoic acid by 0.21 % (p<0.05).

Birds receiving Chiktonikvet also showed higher concentrations of linoleic acid (20.7±1.022, p<0.05), α-linolenic acid (0.42±0.021), and γ-linolenic acid (0.86±0.042) than the control birds.

Overall, supplementation with humic substances significantly improved the fatty acid profile of quail meat by increasing the proportion of polyunsaturated fatty acids.

The concentrations of 18 fatty acids were also determined in quail eggs following dietary supplementation with Humivet and Chiktonikvet (**Table 2**).

Eggs from birds receiving Humivet contained the highest levels of linoleic acid (p<0.05), oleic acid (49.0±2.438 %, p<0.05), and docosahexaenoic acid (0.30±0.014 %).

In Group III, where birds received Chiktonikvet, the concentrations of arachidic acid (0.22±0.011 %, p<0.05), palmitic acid (26.3±1.337 %), stearic acid (7.53±0.377 %), and heptadecanoic acid (0.22±0.011 %, p<0.05) were higher than those in the control group.

Table 2

Fatty acid content in quail eggs following dietary supplementation with Humivet and Chiktonikvet (%)

Fatty acid	Group I (Control)	Group II (Humivet)	Group III (Chiktonikvet)
Arachidic	0.18±0.009	0.17±0.008	0.22±0.011*
Behenic	0.08±0.004	0.11±0.005	0.11±0.005
Linoleic	9.26±0.457	11.7±0.58*	10.6±0.523
Myristic	0.62±0.032	0.52±0.027	0.58±0.03
Myristoleic	0.08±0.004	0.09±0.005	0.09±0.005
Oleic	48.1±2.39	49.0±2.438*	45.6±2.267
Palmitic	23.7±1.203	24.7±1.253	26.3±1.337
Palmitoleic	5.88±0.296	6.19±0.312	6.81±0.343
Stearic	7.38±0.36	7.25±0.377	7.53±0.377
Pentadecanoic	0.03±0.002	0.06±0.003	0.07±0.004
Heptadecanoic	0.14±0.007	0.19±0.008	0.22±0.011*
Heptadecenoic	0.13±0.007	0.06±0.003	0.07±0.004
α-Linolenic	0.16±0.008	0.19±0.009	0.07±0.003
γ-Linolenic	0.26±0.013	0.26±0.014	0.2±0.01
cis-8,11,14-Eicosatrienoic	1.20±0.058	1.10±0.053	1.0±0.049
Eicosapentaenoic	0.20±0.01	0.17±0.008	0.16±0.008
Heneicosanoic	0.10±0.005	0.08±0.004	0.09±0.004
Docosahexaenoic	0.13±0.015	0.30±0.014	0.22±0.01

Note: * p<0.05 compared with the control group.

Quail eggs from the control group contained higher concentrations of eicosapentaenoic (0.20±0.01 %), cis-8,11,14-eicosatrienoic (1.20±0.058 %), and heptadecenoic (0.13±0.007 %) acids. Thus, dietary supplementation with feed additives of different compositions affects the fatty acid profile of quail eggs.

Numerous studies have examined the effect of humic substance supplementation during the fattening period, although the results remain inconsistent [14, 26]. Quail meat is valued for its favorable fatty acid profile, with unsaturated fatty acids typically accounting for 65–70 % of total fat content. Its high content of cardioprotective oleic acid makes it a highly nutritious dietary meat option [23]. A lower proportion of saturated fatty acids in quail meat is generally regarded as an indicator of high dietary value, reflecting a greater content of health-beneficial polyunsaturated fats, an appropriate diet, and well-optimized metabolic processes [23]. Our findings showed that dietary supplementation with the feed additives reduced the percentage of saturated fatty acids in quail meat, with a more pronounced reducing effect observed for Humivet. Oleic acid naturally accounts for approximately 25–40 % of the total fatty acid content of quail eggs [22]. In our study, oleic acid content reached 49.0±2.438 % in eggs and 45.3±2.256 % (p<0.05) in the meat of quails receiving Humivet. An increase in stearic acid content in quail meat can be regarded as a neutral, and in some respects even a beneficial, factor [21]. Our findings showed that, with Humivet supplementation, the content of this acid in meat increased substantially.

It is well established that ω-3 fatty acids are essential for optimal human health. The three principal ω-3 fatty acids are α-linolenic, docosahexaenoic, and eicosapentaenoic acids [11]. The content of ω-3 fatty acids in eggs was highest (0.66 %) in the group of quails receiving the humic substance-based feed additive. Other studies have shown that dietary supplementation with humic-based preparations enriches eggs with

polyunsaturated ω -3 fatty acids [10]. Quail eggs contain approximately 0.9 to 1.3 g of ω -6 fatty acids per 100 g (or about 0.1 to 0.15 g per egg, given an average egg weight of 10–12 g). The principal ω -6 fatty acid in quail eggs is linoleic acid, which typically accounts for 13 % to 20 % of the total fatty acid profile [16]. In our study, the average linoleic acid content in eggs was lowest in the control group (9.26 ± 0.457 %) and highest in the second experimental group (11.7 ± 0.58 %). Other sources report a linoleic acid content of 10.28 % in quail eggs based on the assessment of their saturated and unsaturated fatty acid profile [22]. Nutritionists use data on myristic, palmitic, and stearic acid contents to calculate the overall atherogenic index of a product, which reflects the risk of cardiovascular disease associated with frequent consumption [17]. Our findings showed that in the third group, the sum of these acids reached 34.41 %, compared with 32.47 % in the second group and 31.7 % in the control group. Chiktonikvet supplementation is unlikely to have a direct effect on increasing the content of the above-mentioned acids in eggs; rather, this regulation appears to occur through hepatic lipid synthesis [13]. Humic acids indirectly improve the fatty acid composition of poultry meat and eggs by optimizing digestive processes and modulating the gut microflora [7].

Conclusions

Dietary supplementation of quail diets with the humic substance-based feed additive Humivet, containing 4 % humic acids, at a dose of 4 mL per 1 L of drinking water, significantly ($p < 0.05$) decreased the meat content of saturated fatty acids, with the exception of stearic acid, and increased the content of unsaturated fatty acids. Humivet supplementation also significantly ($p < 0.05$) increased the proportions of linoleic and oleic acids in the fatty acid composition of eggs.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The study was conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), Directive 2010/63/EU, and the ARRIVE guidelines. Animal welfare during slaughter was strictly maintained pursuant to the national legislation, specifically complying with the Requirements for Ensuring Animal Welfare During Slaughter and Killing approved by the Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine [4].

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The author states that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

None.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

During the preparation of this manuscript, the authors used the AI assistant Claude (Anthropic) for limited language editing, improving readability, and translation assistance. The tool was strictly not used for data analysis, interpretation of experimental results, or the generation of original scientific content. Following the use of this technology, the authors thoroughly reviewed, verified, and edited the text as needed, and they take full responsibility for the accuracy and integrity of the final manuscript.

References

1. Derzhspozhyvstandart Ukrainy. (2011). *Dobryva orhanichni ta orhano-mineralni. Metody vyznachannia huminovykh kyslot* [Organic and organo-mineral fertilizers. Methods for determination of humic acids] (DSTU 7083:2009). Kyiv. https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=85315 (in Ukrainian)
2. Derzhstandart Ukrainy. (2003). *Zhyry ta olii tvarynni i roslynni. Pryhotuvannia metylovykh efiriv zhyrnykh kyslot* [Animal and vegetable fats and oils. Preparation of methyl esters of fatty acids] (DSTU ISO 5509:2002). https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=92879 (in Ukrainian)
3. Derzhstandart Ukrainy. (2003). *Zhyry ta olii tvarynni i roslynni. Analizuvannia metodom hazovoi khromatohrafi metylovykh efiriv zhyrnykh kyslot* [Animal and vegetable fats and oils. Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids] (DSTU ISO 5508:2001). https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=92877 (in Ukrainian)
4. Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine. (2022, August 29). *On approval of Requirements for ensuring animal welfare during slaughter and killing* (Order No. 628). Verkhovna Rada of Ukraine. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1244-22#Text> (in Ukrainian)
5. Bialek, M., Wojtak, W., Czauderna, M., Zaworski, K., & Bialek, A. (2026). Lipidomic insight into eggs and meat of quail (*Coturnix japonica*) as potential ‘superfoods’. *Molecules*, 31(3), 407. <https://doi.org/10.3390/molecules31030407>
6. de Melo, B. A. G., Motta, F. L., & Santana, M. H. A. (2016). Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering: C*, 62, 967–974. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.001>
7. Disethle, A. R. P., Marume, U., Mlambo, V., & Hugo, A. (2019). Effects of dietary humic acid and enzymes on meat quality and fatty acid profiles of broiler chickens fed canola-based diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(5), 711–720. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0408>
8. Gálík, B., Hrnčár, C., Gašparovič, M., Rolínek, M., Hanušovský, O., Juráček, M., Šimko, M., Záborský, L., & Kováčik, A. (2023). The effect of humic substances on the meat quality in the fattening of farm pheasants (*Phasianus colchicus*). *Agriculture*, 13(2), 295. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020295>
9. Ghahri, H., Habibian, R., & Fam, M. A. (2010). Evaluation of the efficacy of esterified glucomannan, sodium bentonite, and humic acid to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 34(4), 385–391. <https://doi.org/10.3906/vet-0903-19>
10. Gładkowski, W., Kielbowicz, G., Chojnacka, A., Gil, M., Trziszka, T., Dobrzański, Z., & Wawrzęńczyk, C. (2011). Fatty acid composition of egg yolk phospholipid fractions following feed supplementation of Lohmann Brown hens with humic-fat preparations. *Food Chemistry*, 126(3), 1013–1018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.112>
11. Göçmen, R., Kanbur, G., & Cufadar, Y. (2021). The use of different fat sources on performance, egg quality and egg yolk fatty acids content in laying quails (*Coturnix japonica*). *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 9(8), 1413–1418. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i8.1413-1418.4243>

12. Jad'uttová, I., Marcinčáková, D., Bartkovský, M., Semjon, B., Harčárová, M., Nagyová, A., Váci, P., & Marcinčák, S. (2019). The effect of dietary humic substances on the fattening performance, carcass yield, blood biochemistry parameters and bone mineral profile of broiler chickens. *Acta Veterinaria Brno*, 88(3), 307–313. <https://doi.org/10.2754/avb201988030307>
13. Kamely, M., Karimi, M., & Khosravinia, H. (2016). Omega-3 enrichment of quail eggs: Age, fish oil, and savory essential oil. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(2), 347–359.
14. Lacková, Z., Zigo, F., Farkašová, Z., & Ondrašovičová, S. (2022). The effect of humic substances as an organic supplement on the fattening performance, quality of meat, and selected biochemical parameters of rabbits. *Life*, 12(7), 1016. <https://doi.org/10.3390/life12071016>
15. Marcinčák, S., Semjon, B., Marcinčáková, D., Reitznerová, A., Mudroňová, D., Vašková, J., & Nagy, J. (2023). Humic substances as a feed supplement and the benefits of produced chicken meat. *Life*, 13(4), 927. <https://doi.org/10.3390/life13040927>
16. Mennicken, L., Ponsuksili, S., Tholen, E., Khang, N. T. K., Steiner, K., Petersen, J., Schellander, K., & Wimmers, K. (2005). Divergent selection for ω 3: ω 6 polyunsaturated fatty acid ratio in quail eggs. *Archives Animal Breeding*, 48(5), 527–534. <https://doi.org/10.5194/aab-48-527-2005>
17. Mokhtari, R., & Farhangi, M. A. (2025). Dietary and plasma atherogenic and thrombogenic indices and cardiometabolic risk factors among overweight and individuals with obesity. *BMC Endocrine Disorders*, 25(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12902-025-01844-0>
18. Ozturk, E., Ocak, N., Turan, A., Erener, G., Altop, A., & Cankaya, S. (2011). Performance, carcass, gastrointestinal tract and meat quality traits, and selected blood parameters of broilers fed diets supplemented with humic substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(1), 59–65. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4541>
19. Schepetkin, I. A., Khlebnikov, A. I., Ahn, S. Y., Woo, S. B., Jeong, C.-S., Klubachuk, O. N., & Kwon, B. S. (2003). Characterization and biological activities of humic substances from Mumie. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5245–5254. <https://doi.org/10.1021/jf021101e>
20. Semjon, B., Marcinčáková, D., Koréneková, B., Bartkovský, M., Nagy, J., Turek, P., & Marcinčák, S. (2020). Multiple factorial analysis of physicochemical and organoleptic properties of breast and thigh meat of broilers fed a diet supplemented with humic substances. *Poultry Science*, 99(3), 1750–1760. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.012>
21. Shen, X., Miao, S., Zhang, Y., Guo, X., Li, W., Mao, X., & Zhang, Q. (2025). Stearic acid metabolism in human health and disease. *Clinical Nutrition*, 44, 222–238. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2024.12.012>
22. Tokuşoğlu, Ö. (2006). The quality properties and saturated and unsaturated fatty acid profiles of quail egg: the alterations of fatty acids with process effects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(7-8), 537–545. <https://doi.org/10.1080/09637480601049725>
23. Tomaszewska, E., Domaradzki, P., Drabik, K., Kasperek, K., Puzio, I., Burmańczuk, A., Batkowska, J., Arciszewski, M. B., & Muszyński, S. (2025). Long-term dietary glutamine supplementation modulates fatty acid profile and health indices in quail meat. *Poultry Science*, 104(8), 105290. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.105290>
24. Vašková, J., Stupák, M., Vidová Ugurbaş, M., Žatko, D., & Vaško, L. (2023). Therapeutic efficiency of humic acids in intoxications. *Life*, 13(4), 971. <https://doi.org/10.3390/life13040971>
25. Zanin, L., Tomasi, N., Cesco, S., Varanini, Z., & Pinton, R. (2019). Humic substances contribute to plant iron nutrition acting as chelators and biostimulants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 675. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00675>
26. Zigo, F., Vargová, M., Veszelits Laktičová, K., & Mišková, J. (2020). Effect of humic acid as an organic additive on growth performance, carcass traits and selected blood parameters of Japanese quails. *International Journal of Avian & Wildlife Biology*, 5(2), 27–30. <https://doi.org/10.15406/ijawb.2020.05.00170>

ORCID

M. Stankov 

<https://orcid.org/0009-0002-3817-6266>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Economic and therapeutic efficacy of specific and complex therapy of dogs for cystoisosporiasis

V. Melnychuk  | V. Yevstafieva | N. Shcherbakova

Article info

Correspondence Author

V. Melnychuk

E-mail:

vitaliy.melnichuk@pdau.edu.ua

Poltava State Agrarian

University,

Skovoroda Str., 1/3,

Poltava, 36000, Ukraine

Citation: Melnychuk, V., Yevstafieva, V., & Shcherbakova, N. (2026). Economic and therapeutic efficacy of specific and complex therapy of dogs for cystoisosporiasis. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 135–140. doi: 10.31210/spi2026.29.02.20

Measures to control canine cystoisosporiasis must be implemented complexly, where one of the criteria for their efficacy is the correct choice of the necessary treatment methods, as well as their economic expediency. For this purpose, scientists use a certain range of anti-parasitic preparations, which have different composition, method of application, duration of action, different effectiveness and cost. The aim of the research was to establish the economic and therapeutic efficacy of the specific and complex therapy of dogs with spontaneous cystoisosporiasis. In experimental conditions, specific preparations of domestic production “Turil® 5%” (the active substance is toltrazuril), “Koktsifen” (the active substances are toltrazuril, fenbendazole), as well as their combination with the probiotic “ModeS Kombiflor Probiotic” (the active substances are *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, Slovenia) were tested. It has been found that the most effective for the specific therapy of dogs suffering from cystoisosporiasis are “Koktsifen” and “Turil® 5%”, which ensure 100.0% extense- and intense-effectiveness, respectively, on the 7th and 14th days of treatment. The complex treatment of dogs with cystoisosporiasis in case of the simultaneous use of the specific preparations “Koktsifen” and “Turil® 5%”, as well as the probiotic “ModeS Kombiflor Probiotic” increases the effectiveness of the specific therapy, shortens the recovery period of animals, where the extense- and intense-effectiveness reaches 100.0% on the 4th and 5th days of treatment, respectively. It was determined that the cheapest of the tested treatment regimens for canine cystoisosporiasis was the use of “Turil® 5%” preparation, where the cost of treatment per dog made 14.40 UAH, which is 12.60 UAH less than in case of the application of “Koktsifen” preparation and 154.9 and 167.5 UAH less than in case of the use of the complex therapy, which included the simultaneous use of “Turil® 5%” with “ModeS Kombiflor Probiotic” as well as “Koktsifen” with “ModeS Kombiflor Probiotic”, respectively. The obtained results of determining the economic and therapeutic efficacy of the tested preparations to control canine cystoisosporiasis allow us to recommend the specific drugs “Koktsifen”, “Turil® 5%” and the probiotic “ModeS Kombiflor Probiotic”.

Keywords: canine cystoisosporiasis, treatment, economic efficiency, medicines.

Економічна та лікувальна ефективність специфічної і комплексної терапії собак за цистоізо sporозу

В. В. Мельничук | В. О. Євстаф'єва | Н. С. Щербакова

Полтавський державний
аграрний університет,
м. Полтава, Україна

Заходи боротьби за цистоізо sporозу собак необхідно здійснювати комплексно, де одним з критеріїв їх ефективності є правильний вибір необхідних методів лікування, а також їх економічна доцільність. З цією метою вчені використовують певний спектр протипаразитарних препаратів, які мають різний склад, спосіб застосування, тривалість дії, ефективність і вартість. Метою досліджень було встановити економічну та лікувальну ефективність специфічної й комплексної терапії собак із спонтанного цистоізо sporозу. В експериментальних умовах випробували специфічні препарати вітчизняного виробництва «Турил® 5 %» (ДР – толтразурил), «Кокцифен» (ДР – толтразурил, фенбендазол), а також їх поєднання з пробіотиком «ModeS Kombiflor Probiotic» (ДР – *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*; Словенія). Встановлено, що найбільш ефективними для специфічної терапії собак за цистоізо sporозу є «Кокцифен» та «Турил® 5 %», які забезпечують 100,0 %-ву екстенс- та інтенсеефективність відповідно на 7-му та 14-ту добу лікування. Комплексне лікування собак за цистоізо sporозу під час одночасного застосування специфічних препаратів «Кокцифену» та «Турилу® 5 %», а також пробіотика «ModeS Kombiflor Probiotic» підвищує ефективність специфічної терапії, скорочує термін одужання тварин, де екстенс- та інтенсеефективність сягають 100,0 % на 4-ту та 5-ту добу лікування відповідно. Визначено, що найбільш дешевим із випробуваних схем лікування за цистоізо sporозу собак, виявилось застосування препарату «Турил® 5 %», де вартість лікувальних заходів на одну собаку становить 14,40 грн, що на 12,60 грн менше, ніж у разі застосування препарату «Кокцифен» та на 154,9 і 167,5 грн менше, ніж у разі застосування комплексної терапії, що включала одночасне застосування «Турилу® 5 %» і «ModeS Kombiflor Probiotic» та «Кокцифену» і «ModeS Kombiflor Probiotic» відповідно. Отримані результати визначення економічної та лікувальної ефективності випробуваних препаратів у боротьбі з цистоізо sporозом собак дозволяють рекомендувати специфічні препарати «Кокцифен», «Турил® 5 %» та пробіотик «ModeS Kombiflor Probiotic».

Ключові слова: цистоізо sporоз собак, лікування, економічна ефективність, лікарські засоби.



Бібліографічний опис для цитування: Мельничук В. В., Євстаф'єва В. О., Щербакова Н. С. Економічна та лікувальна ефективність специфічної і комплексної терапії собак за цистоізо sporозу. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 135–140.

Introduction

It is known that coccidia of the genus *Cystoisospora* are wide spread pathogens of intestinal parasitoses in dogs, cats, and humans worldwide. Dogs are definitive hosts for 4 known species of cystoisosporos: *Cystoisospora canis*, *C. ohioensis*, *C. neorivolta*, and *C. burrowsi*. Moreover, stray domestic dogs play a significant role in the spread of cystoisosporiasis and pose a serious threat to nature protection and public health worldwide [1–5].

Measures to control canine cystoisosporiasis must be implemented complexly, where one of the criteria for their effectiveness is the correct choice of the necessary treatment methods. For this purpose, scientists use a certain range of anti-parasitic preparations, which have various composition, method of application, duration of action and different efficacy [6–11].

The researchers found that the treatment of 35-day-old puppies with toltrazuril turned out to be highly effective (100 %) in the control of canine cystoisosporiasis. The authors also report that to maintain stable well-being in kennels against this infestation, it is necessary to strictly follow the sanitary and hygienic order and prophylactic antiprotozoal treatments with toltrazuril based preparations [12].

The researchers treated the puppies with trimethoprim and sulfamethoxazole at a dose of 40 mg/kg body weight in combination with metronidazole at a dose of 10 mg/kg body weight twice a day for 5 days, while the simultaneous using infusion therapy. All animals demonstrated complete clinical recovery, as it was confirmed by coproscopic examinations [13]. The similar results also were obtained by other authors who used sulfadimethoxine alone and in combination with trimethoprim, which proved effective in the treatment of dogs and cats with cystoisosporiasis [14–16].

The effectiveness of modern preparations “Profiline Coccid” (the active substances are toltrazuril and moxidectin) and “Procox® for dogs” (the active substances are toltrazuril and emodepside) in case of spontaneous canine cystoisosporiasis was revealed by Ukrainian scientists. They found that after oral administration of the drugs according to their

instructions on the 3rd and 7th days, the intense-effectiveness of “Profiline Coccid” made 53.0 and 85.2 %, respectively, and the intense-effectiveness of “Procox® for dogs” – 56.0 and 87.3 %, respectively. Later on, during coproovoscopic examinations on the 14th, 21st, 28th and 35th days, the extense-and intense-effectiveness made 100 %, which indicates a high effectiveness of the above-mentioned preparations [17].

At the same time, there are no data in the available literature on the expediency of using complex treatment of dogs with cystoisosporiasis using probiotics, which may prevent the emergence of resistance in protozoa to antiprotozoal drugs, as well as increase the effectiveness of therapy and reduce the recovery time of the organism of infected dogs, especially young ones.

The aim of the study

The aim of the research was to establish the economic and therapeutic effectiveness of the specific and complex therapy of dogs with spontaneous cystoisosporiasis.

Materials and methods

The research was conducted during 2025–2026 at the Parasitology laboratory of Poltava State Agrarian University and in the private veterinary clinic “Dovira” (city of Kharkiv).

The effectiveness of the specific and complex therapy for spontaneous canine cystoisosporiasis was experimentally tested, namely: of the specific preparations – “Turil® 5%” (the active substance is toltrazuril, “Vetsintez” LLC, Ukraine), “Koktsifen” (the active substances are toltrazuril, fenbendazole, “Product” LLC, Ukraine), as well as their combination with the probiotic “ModeS Kombiflor Probiotic” (the active substances are *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, Maribor, Slovenia).

The study was conducted on dogs aged 2–4 months, spontaneously infected with cystoisosporos. Four groups, each consisting of 8 dogs, were formed and received the specific and complex therapy (**Table 1**).

Table 1

The preparations’ schemes of use for canine cystoisosporiasis (n=8)

Preparation, (medicine form)	Producer, country	Active substance	Frequency and method of application	Equivalent per 1 kg of animal body weight
“Turil® 5 %” (oral suspension)	“Vetsintez” LLC, Ukraine	toltrazuril, 50 mg	0.2 ml/kg of animal body weight, once a day for 3 days	10 mg of toltrazuril
“Koktsifen” (oral suspension)	“Product” LLC, Ukraine	toltrazuril, 20 mg, fenbendazole, 50 mg <i>Lactobacillus</i> spp. 5.5×10^6 CFU/g <i>Bifidobacterium bifidum</i> 1.5×10^6 CFU/g <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> 6.0×10^6 CFU/g	1 ml/kg of animal body weight, once	20 mg of toltrazuril, 50 mg of fenbendazole
“ModeS Kombiflor Probiotic” (powder)	ModeS International d.o.o, 2000 Maribor, Slovenia		1 sachet (2 g) per animal weighing up to 5 kg of body weight once a day for 7 days	

“Turil® 5 %” was administered orally to the dogs in the first experimental group, at a dose of 0.2 ml/kg of animal body weight once a day for 3 days. The dogs of the

second experimental group were administered “Koktsifen” orally, at a dose of 1.0 ml/kg of animal body weight once. The dogs of the third experimental group were

simultaneously administered “Turil® 5 %” and “ModeS Kombiflor Probiotic” orally together with food at a dose of 2 g/5 kg of animal body weight, once a day, for 7 days. The dogs of the fourth experimental group were administered “Koksifen” and “ModeS Kombiflor Probiotic”.

The effectiveness of the specific and complex therapy was determined on the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 7th and 14th day after the use of the drugs based on the results of coproovoscopic examinations of the dogs in the experimental groups according to the methodology [18].

The economic efficiency of the tested treatment regimens for dogs with cystoisosporiasis was carried out taking into account: the number of animals in the experiment; the number of animals that recovered; the average weight of one experimental animal; the frequency

of the preparations’ use; their cost; the amount of the preparations used per animal; the expenses of treatment per animal and the experimental group of dogs.

The mathematical analysis of the obtained data was conducted using the Microsoft “EXCEL” applied programs’ package by determining the arithmetic mean (M) and the standard error (m).

Results and discussion

In the process of comparing the therapeutic efficacy of specific drugs based on toltrazuril, but with its different dosages, at spontaneous canine cystoisosporiasis, it has been found that the preparations “Turil® 5 %” and “Koksifen” are effective, where on the 14th and 7th days, respectively, their extense- and intenseeffectiveness reached 100.0 % (Fig. 1, 2).

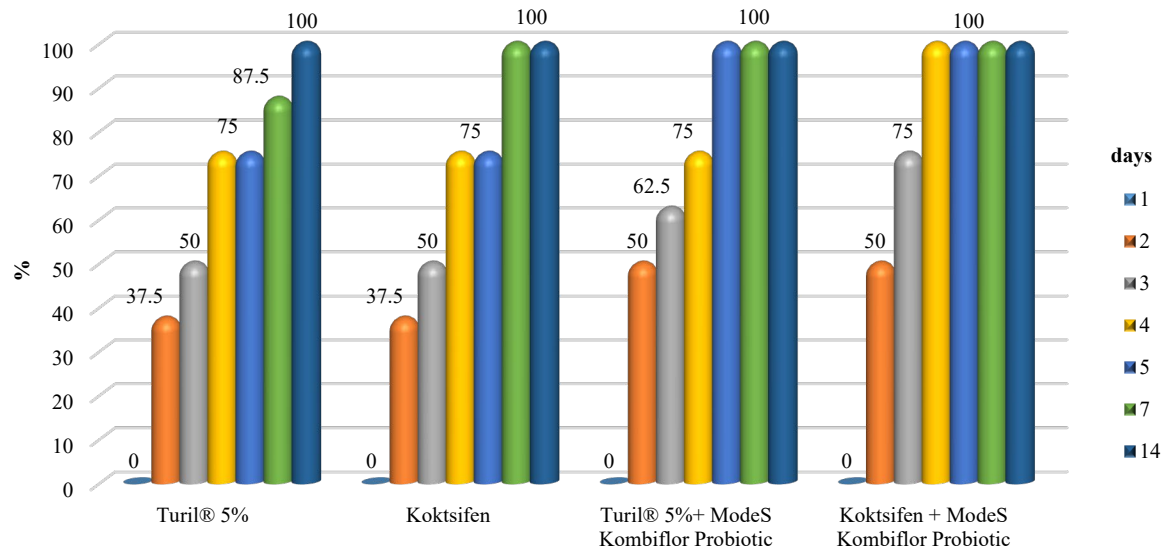


Fig. 1. The extenseeffectiveness of the specific and complex therapy of dogs in case of spontaneous cystoisosporiasis (n=8)

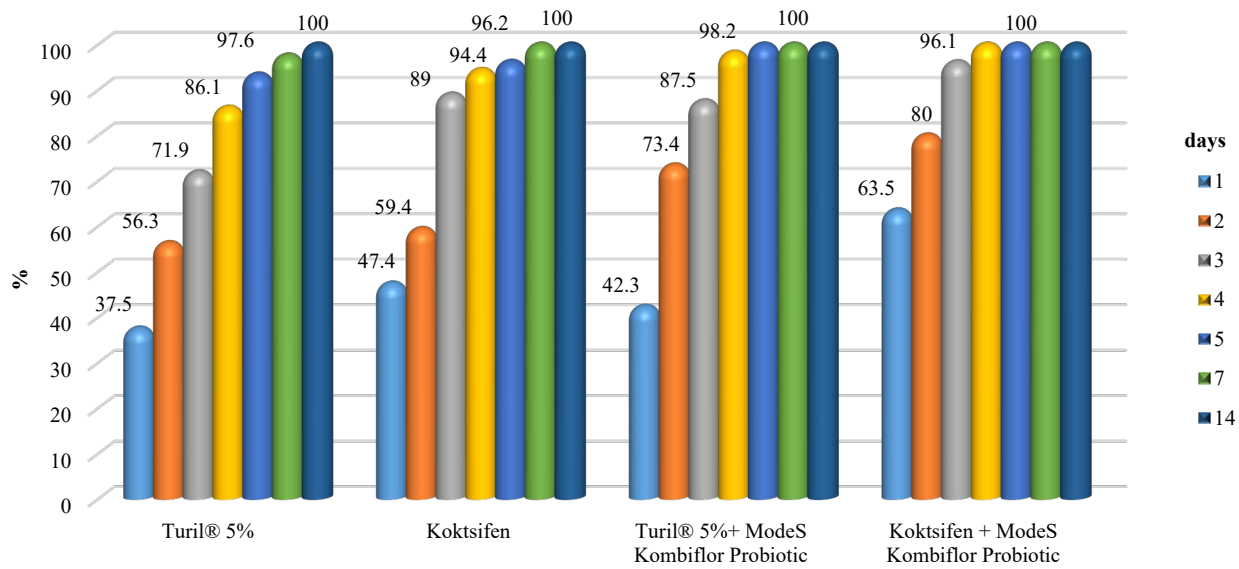


Fig. 2. The intenseeffectiveness of the specific and complex therapy of dogs in case of spontaneous cystoisosporiasis (n=8)

It was found that the use of the probiotic “ModeS Kombiflor Probiotic” increased the therapeutic efficacy of the specific preparations “Koksifen” and “Turil® 5 %”. During the application of “Koksifen” with “ModeS Kombiflor Probiotic” to the experimental dogs, the EE and IE of the drugs gradually increased from the 1st to the 3rd day from 0 and 63.5 % to 75.0 and 96.1 %, respectively. Already from the 4th day, the EE and IE made 100.0 %.

During the application of “Turil® 5 %” with “ModeS Kombiflor Probiotic” to the experimental dogs, the EE and IE also gradually increased from the 1st to the

4th day from 0 and 42.3 % to 75.0 and 98.2 %, respectively. Already from the 5th day, the EE and IE made 100.0 %.

It was determined that the expenses on treating the dogs suffering from cystoisosporiasis with the specific drugs amounted to: at applying “Turil® 5 %” – 115.20 UAH, “Profiline Coccid” – 192.80 UAH. At the same time, the costs for treating the infected dogs using the complex therapy amounted to: at applying “Turil® 5 %” + “ModeS Kombiflor Probiotic” – 1354.48 UAH, “Koksifen” + “ModeS Kombiflor Probiotic” – 1455.28 UAH (*Table 2*).

Table 2

Economic indicators of using the specific and complex therapy of dogs with cystoisosporiasis invasion

Indicators	Preparations			
	“Turil® 5 %”	“Koksifen”	“Turil® 5 %” + “ModeS Kombiflor Probiotic”	“Koksifen” + “ModeS Kombiflor Probiotic”
Frequency of the preparation administration	3	1	3 + 7	1 + 7
Recovered animals, heads	8	8	8	8
The cost of the preparation, UAH, medicine form (volume)	120.00 bottle (10 ml)	135.00 bottle (10 ml)	120.00 bottle (10 ml) + 332.00, cardboard box with 15 sachets (2 g each)	135.00 bottle (10 ml) + 332.00, cardboard box with 15 sachets (2 g each)
The preparation used per animal	1.2 ml	2.0 ml	1.2 ml + 7 sachets	2.0 ml + 7 sachets
The cost of the preparation dose per animal, UAH	14.40	27.00	169.31	181.91
The expenses for treatment of the experimental group of animals, UAH	115.20	216.00	1354.48	1455.28

It has been found that the cheapest of the tested treatment regimens for canine cystoisosporiasis was the use of “Turil® 5 %” preparation, where the cost of treatment per dog is 14.40 UAH, which is 12.60 UAH less than in the case of applying “Koksifen” preparation and 154.9 and 167.5 UAH less than in the case of the use of complex therapy, which included the combination of “Turil® 5 %” with “ModeS Kombiflor Probiotic” and “Koksifen” with “ModeS Kombiflor Probiotic”, respectively. At the same time, according to the definition of effectiveness, it was the use of the complex therapy that led to high (100.0 %) efficacy rates in a short period of time (4 days) with the complete recovery of dogs.

Various anti-parasitic preparations are used for the treatment and prevention of canine cystosporiasis. In recent years, many complex drugs have appeared that are used to control helminthiasis in domestic carnivores. However, there is very little information on the therapeutic efficacy and economic expediency of applying preparations to control canine cystosporiasis [6, 9, 10, 19]. Therefore, the aim of our research was to establish the economic and therapeutic effectiveness of the specific and complex therapy of dogs with spontaneous cystoisosporiasis.

According to the results of comparing the therapeutic efficacy of the specific therapy with the use of toltrazuril based drugs with its different dosages (“Turil® 5 %” – 10 mg/kg of body weight; “Koksifen” – 20 mg/kg of body weight), it was found that the preparations “Koksifen” and “Turil® 5 %” turned out to be effective, where on the 7th and 14th days, respectively, their extense- and intense-effectiveness reached 100.0 %. It was discovered that the use of the probiotic “ModeS

Kombiflor Probiotic” increased the therapeutic efficacy of the specific preparations “Koksifen” and “Turil® 5 %”, where on the 4th and 5th days of the treatment, respectively the extense- and intense-effectiveness reached 100.0 %.

The high therapeutic efficacy of toltrazuril based drugs during the treatment of dogs with cystoisosporiasis invasion has been reported in the scientific literature. In particular, 90.2–100 % efficacy of “Procox®” suspension for dogs (the active substances are emodepside, toltrazuril) against *C. canis* and *C. ohioensis-complex* was established [9]. Also, the researchers note 100.0 % efficacy of the preparation “One®” (Lab. Bio Zoo, containing 150 mg of toltrazuril) on the 5th day of the treatment, which was given to dogs suffering from cystoisosporiasis at a dose of 1 tablet per 10 kg of body weight, once a day, for 5 days [20]. Other scientists established 100.0% efficacy of the modern preparations “Profiline Coccid” (the active substances are toltrazuril and moxidectin) and “Procox® for dogs” (the active substances are toltrazuril and emodepside) for spontaneous canine cystoisosporiasis on the 14th, 21st, 28th and 35th days of the experiment [17].

The obtained results of experimental studies allow us to recommend for infected dogs the use of the complex therapy, which combines the specific preparations “Koksifen” or “Turil® 5 %” and the probiotic “ModeS Kombiflor Probiotic”, for the effective control of cystoisosporiasis invasion.

Conclusions

The high economic and therapeutic efficacy of the specific preparations “Koksifen” and “Turil® 5 %” has

been established for canine cystoisosporiasis when on the 7th and 14th days of treatment the effectiveness reach 100.0 %, and the cost of the treatment measures per dog using “Turil® 5 %” makes 14.40 UAH and “Koktsifen”– 27.00 UAH. The complex use of the specific preparations “Koktsifen” and “Turil® 5 %”, as well as the probiotic “ModeS Kombiflor Probiotic”, although more expensive, at the same time increases the therapeutic effectiveness of the specific therapy up to 100.0 % and simultaneously reduces the recovery period of animals to the 4th and 5th days, respectively.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The authors declare that all conducted studies fully comply with generally accepted norms of humane treatment of animals and the principles of bioethics. The clinical part of the work was performed in strict accordance with the requirements of the current legislation of Ukraine, in particular the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty", as well as Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. All diagnostic manipulations and procedures were carried out exclusively after obtaining official informed consent from the animal owners for participation in the study. During the study, the sick dogs were provided with proper housing conditions, quality care, balanced feeding, and full minimization of any stress, pain, or discomfort factors.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgements

The authors express their sincere gratitude to everyone who contributed to this research and supported the completion of this study.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The authors declare that no generative AI or AI-assisted technologies were used during the preparation, writing, translation, or language polishing of this manuscript. The final content was fully authored and reviewed by the researchers, who take full responsibility for the work.

References

- Buehl, I. E., Prosl, H., Mundt, H.-C., Tichy, A. G., & Joachim, A. (2006). Canine isosporosis – epidemiology of field and experimental infections. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53(10), 482–487. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00973.x>
- Zhang, Y., Qin, Z., Zhang, K., Lang, J., Wang, N., Niu, Y., & Zhang, L. (2023). Morphological and molecular biology identification of *Cystoisospora* sp. in the blue fox, *Alopex lagopus* (Linnaeus, 1758). *Parasitology Research*, 123(1), 35. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-08044-6>
- He, P., Li, J., Gong, P., Huang, J., & Zhang, X. (2012). *Cystoisospora* spp. from dogs in China and phylogenetic analysis of its 18S and ITS1 gene. *Veterinary Parasitology*, 190(1-2), 254–258. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.025>
- Idrissi, H., Khatat, S. E. H., Duchateau, L., Kachani, M., Daminet, S., El Asatey, S., Tazi, N., Azrib, R., & Sahibi, H. (2022). Prevalence, risk factors and zoonotic potential of intestinal parasites in dogs from four locations in Morocco. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 34, 100775. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100775>
- Xhaxhiu, D., Kusi, I., Rapti, D., Kondi, E., Postoli, R., Rinaldi, L., Dimitrova, Z. M., Visser, M., Knaus, M., & Rehbein, S. (2010). Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *Parasitology Research*, 108(2), 341–353. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2067-8>
- Lloyd, S., & Smith, J. (2001). Activity of toltrazuril and diclazuril against *Isospora* species in kittens and puppies. *Veterinary Record*, 148(16), 509–511. <https://doi.org/10.1136/vr.148.16.509>
- Daugeschies, A., Mundt, H.-C., & Letkova, V. (2000). Toltrazuril treatment of cystoisosporosis in dogs under experimental and field conditions. *Parasitology Research*, 86(10), 797–799. <https://doi.org/10.1007/s004360000217>
- Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (2019). Coccidiosis in dogs – 00 years of progress. *Veterinary Parasitology*, 266, 34–55. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.004>
- Altretuer, G., Gasda, N., Adler, K., Hellmann, K., Thuriel, H., Schimmel, A., Hutchens, D., & Krieger, K. J. (2011). Field Evaluations of the efficacy and safety of emodepside plus toltrazuril (Procox® oral suspension for dogs) against naturally acquired nematode and *Isospora* spp. infections in dogs. *Parasitology Research*, 109(S1), 21–28. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2399-z>
- Litster, A. L., Nichols, J., Hall, K., Camp, J., & Mohamed, A. S. (2014). Use of ponazuril paste to treat coccidiosis in shelter-housed cats and dogs. *Veterinary Parasitology*, 202(3-4), 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.003>
- Petry, G., Kruehwagen, E., Kampkoetter, A., & Krieger, K. (2011). Efficacy of emodepside/toltrazuril suspension (Procox® Oral suspension for dogs) against mixed experimental *Isospora felis/Isospora rivolta* infection in cats. *Parasitology Research*, 109(S1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2400-x>
- Barrera, J. P., Montoya, A., Marino, V., Sarquis, J., Checa, R., & Miró, G. (2024). *Cystoisospora* spp. infection at a dog breeding facility in the Madrid region: Infection rate and clinical management based on toltrazuril metaphylaxis. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 48, 100971. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100971>
- Garanayak, N., Gupta, A. R., & Patra, R. C. (2016). Successful therapeutic management of canine Isosporosis in puppies. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(1), 48–50. <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0747-0>
- Wilkinson, G. (1977). Coccidial infection in a cat colony. *Veterinary Record*, 100(8), 156–157. <https://doi.org/10.1136/vr.100.8.156>
- Dunbar, M. R., & Foreyt, W. J. (1985). Prevention of coccidiosis in domestic dogs and captive coyotes (*Canis latrans*) with sulfadimethoxine-ormetoprim combination. *American Journal of Veterinary Research*, 46(9), 1899–1902. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1985.46.09.1899>
- Lindsay, D. S., & Blagburn, B. L. (1995). Practical treatment and control of infections caused by canine gastrointestinal parasites. *Veterinary Medicine*, 89, 441–455.
- Tishyn, O. L., Yuskiv, I. D., & Yuskiv, L. L. (2023). Comparative assessment of complex drugs based on toltrazuril and moxidectin and toltrazuril and emodepside for nematodes and cystoisosporosis of dogs. *Scientific and Technical Bulletin Of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives And Institute of Animal Biology*, 24(2), 206–215. <https://doi.org/10.36359/scivp.2023-24-2.23>
- Melnichuk, V. V., Kitichenko, A. S., Suvorov, R. S., Pohorelova, H. M., Yevstafieva, V. O., & Gud, N. V. (2025). *Sposib koproskovichnoho doslidzhennia sobak na naiavnist yaitis zbudnykiv nematodoziv travnoho traktu ta ootsyst tsystoisospor* [Method of coproscopic examination of dogs for the presence of eggs of pathogens of the digestive tract nematodes and oocysts of cystoisosporosis] (Ukrainian Patent No. u202405785). Ukrainian Intellectual Property Institute. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1861787/> (in Ukrainian)

19. Fadila, K. A., & Kusumarini, S. (2024). Diagnosis, hematologic profile, and treatment of cystoisosporiasis in domestic dog. *Jurnal Medik Veteriner*, 7(1), 205–211.
<https://doi.org/10.20473/jmv.vol7.iss1.2024.205-211>
20. Ibarra-Velarde, F., Vera-Montenegro, Y., Saldaña-Hernández, N., & Ochoa-Galván, P. (2014). Comparison of the efficacy of two commercial coccidicidal compounds on experimentally infected dogs. *Pharmacology & Pharmacy*, 5(13), 1163–1170.
<https://doi.org/10.4236/pp.2014.513127>

ORCID

V. Melnychuk 
 V. Yevstafieva 
 N. Shcherbakova 

<https://orcid.org/0000-0003-1927-1065>

<https://orcid.org/0000-0003-4809-2584>

<https://orcid.org/0000-0002-3573-7673>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Developmental and histochemical study of the reproductive system in female dogs during the postnatal period

N. M. Ahmed  | N. A. S. Younis | R. A. A. Naser

Article info

Correspondence Author

N. M. Ahmed

E-mail:

noon.m.a@uodiyala.edu.iq

College of Veterinary
Medicine, University of
Diyala,
Al-Muradia, Old Baghdad-
Baqubah Road, Baqubah,
32001, Diyala, Iraq

Citation: Ahmed, N. M., Younis, N. A. S., & Naser, R. A. A. (2026). Developmental and histochemical study of the reproductive system in female dogs during the postnatal period. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 141–149. doi: 10.31210/spi2026.29.02.21

The early postnatal organogenesis of the canine female reproductive tract marks a critical phase of morphofunctional and histochemical remodeling. This study targeted the biological characterization of age-dependent tissue development in the ovaries, uterus, and oviducts of female canine puppies between the 3rd and 8th weeks of postnatal life. Experimental procedures were executed using healthy female puppies divided into two age-matched cohorts (n=3). Excised tissue samples were fixed in 10 % neutral buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 4–7 μm , and subjected to hematoxylin-eosin, Alcian blue (pH 2.5), and Periodic acid–Schiff (PAS) staining. Morphometric processing was performed using the Fiji ImageJ software, and mean differences were statistically evaluated via the independent samples Student t-test using SPSS. Histochemical evaluation confirmed the physiological initiation of endometrial secretory activity, as marked by the transition of neutral mucopolysaccharides within the uterine glands from a completely negative profile at 3 weeks to a distinct weak positive reaction by the 8th week of age. Morphometrically, the uterine wall exhibited highly significant vertical cellular hypertrophy of the luminal lining, manifested by a 5.2-fold increase in epithelial height from $5.50 \pm 0.93 \mu\text{m}$ to $28.50 \pm 2.91 \mu\text{m}$ ($P=0.0001$). Concurrently, intense longitudinal organ elongation resulted in a significant 39.4 % reduction in total uterine wall thickness from $447.40 \pm 53.45 \mu\text{m}$ to $271.30 \pm 40.45 \mu\text{m}$ ($P=0.0303$) and a synchronized 39.3% reduction in total oviductal wall thickness from $220.00 \pm 29.74 \mu\text{m}$ to $133.50 \pm 4.71 \mu\text{m}$ ($P=0.0207$). While the primary inner oviductal luminal epithelium maintained strict cytological stability between the 3rd and 8th weeks ($10.00 \pm 1.76 \mu\text{m}$ versus $11.90 \pm 1.53 \mu\text{m}$, respectively; $P=0.4407$), the functional ovarian cortex exhibited active folliculogenesis, characterized by a statistically significant 23.6 % linear expansion of the primordial follicle diameter from $27.50 \pm 1.20 \mu\text{m}$ to $34.00 \pm 1.85 \mu\text{m}$ ($P<0.05$). These quantitative relative and absolute indices establish definitive baseline criteria for mammalian reproductive histogenesis and provide critical reference profiles for evaluating developmental pathology in canine veterinary medicine.

Keywords: endometrial maturation, histomorphometry, neutral mucins, ovarian cortex, uterine development, canine female puppies.

Розвиток та гістохімічне дослідження репродуктивної системи самок собак у постнатальний період

Н. М. Ахмед | Н. А. С. Юніс | Р. А. А. Насер

Факультет ветеринарної
медицини, Університет
Діялі,
м. Баакуба, Ірак

Ранній постнатальний органогенез репродуктивної системи ссавців закладає критичну морфологічно-функціональну основу для подальшого статевого дозрівання та фертильності. Дане дослідження присвячене характеристиці вікових закономірностей розвитку тканин яєчників, матки та яйцепроводів самок цуценят у хронологічному інтервалі між 3-м та 8-м тижнями постнатального періоду. Експерименти проводили на клінічно здорових тваринах, розділених на дві вікові групи. Зразки органів фіксували в 10 % нейтральному формаліні, заливали в парафін, нарізали зрізи товщиною 4–7 мкм та фарбували гематоксилін-еозином, алціановим синім (рН 2,5) та піддавали ШПК-реакції. Морфометрію шарів тканин виконували в програмі Fiji ImageJ з подальшим статистичним аналізом даних за допомогою двовибіркового t-критерію Стюдента в пакеті програм SPSS. Гістохімічно встановлено початок функціонального дозрівання ендометрію, що виражалося у переході секретії нейтральних мукополісахаридів у маткових залозах від абсолютно негативної реакції у 3 тижні до слабкопозитивної у 8-тижневого віці. Морфометрично зафіксовано високозначущу вертикальну клітинну гіпертрофію епітелію слизової оболонки матки, висота якого збільшилася у 5,2 раза – з $5,50 \pm 0,93 \mu\text{м}$ до $28,50 \pm 2,91 \mu\text{м}$ ($P=0.0001$). Одночасно з цим подовження видовження органів призвело до фізіологічного стоншення шарів, зокрема: товщина стінки матки зменшилася на 39,4 % – з $447,40 \pm 53,45 \mu\text{м}$ до $271,30 \pm 40,45 \mu\text{м}$ ($P=0.0303$), а товщина стінки яйцепроводу скоротилася на 39,3 % – з $220,00 \pm 29,74 \mu\text{м}$ до $133,50 \pm 4,71 \mu\text{м}$ ($P=0.0207$). На тлі повної цитологічної стабільності епітелію слизової оболонки яйцепроводу між 3-м та 8-м тижнями ($10,00 \pm 1,76 \mu\text{м}$ проти $11,90 \pm 1,53 \mu\text{м}$ відповідно; $P=0.4407$), у корі яєчника спостерігався стабільний фолікулогенез із закономірним лінійним збільшенням діаметра примордіальних фолікулів на 23,6 % – з $27,50 \pm 1,20 \mu\text{м}$ до $34,00 \pm 1,85 \mu\text{м}$ ($P<0.05$). Отримані якісні та кількісні показники мають суттєву практичну цінність для діагностики вроджених патологій розвитку та ендокринних порушень у сук.

Ключові слова: дозрівання ендометрію, гістоморфометрія, нейтральні муцини, кора яєчника, розвиток матки, самки цуценят.



Бібліографічний опис для цитування: Ахмед Н. М., Юніс Н. А. С., Насер Р. А. А. Розвиток та гістохімічне дослідження репродуктивної системи самок собак у постнатальний період. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 141–149.

Introduction

At birth, the morphologically indifferent reproductive system undergoes phenotypic sexual differentiation driven by the expression of the sex-determining region Y (SRY) gene on the Y chromosome [1]. The internal genital tracts of males and females are primarily derived from the paired mesonephric (Wolffian) and paramesonephric (Müllerian) ducts, respectively [2]. The vertebrate urogenital complex, comprising the kidneys, gonads, and urinary and reproductive tracts, initiates development during gastrulation via the differentiation of the intermediate mesoderm [3]. The formation of the renal tubules, testes, and female reproductive tracts involves extensive embryonic tissue proliferation and mesenchymal-to-epithelial transition. Prior to phenotypic sexual differentiation, mammalian embryos characteristically possess both pairs of genital ducts. In the male embryo, the Wolffian ducts differentiate into the epididymides, vasa deferentia, and seminal vesicles. Conversely, the Müllerian ducts develop adjacent to the mesonephric structures, subsequently giving rise to the oviducts, uterus, cervix, and cranial vagina [4].

Postnatal development of the female reproductive organs represents a continuous physiological progression intricately linked to prenatal organogenesis, which systematically extends through puberty until the attainment of full sexual maturity [5]. In heifers, a substantial increase in uterine weight, closely correlated with circulating gonadal hormone profiles, is observed up to the sixth month of life, after which the developmental growth rate typically plateaus [6]. Comparable postnatal macro-morphological changes, including distinct fluctuations in vaginal length and weight, have been documented in West African dwarf goats [7], while age-dependent histological modifications of the vaginal wall with maturity have been described in domestic pigs [8]. Furthermore, specific gross anatomical variations exist among distinct mammalian orders; for instance, the female guinea pig characteristically lacks a distinct vestibule at the caudal terminus of the reproductive tract, with the external vaginal orifice directly marking the functional termination of the vagina [9]. Unlike males, which maintain active spermatogenesis throughout their entire reproductive lifespan, mammalian females possess a finite, non-renewable pool of primordial oocytes established strictly at birth [5].

The aim of the study

The aim of the current study was to investigate the postnatal macro-morphological, histological, and histochemical development of the female reproductive system in canine puppies during the early postnatal period. Specifically, this work aimed to provide a comparative quantitative and qualitative evaluation of structural and morphometric alterations in the ovaries, uterus, and oviducts between the third and eighth weeks of age, establishing a baseline for understanding tissue remodeling and early organogenesis in canine females.

Materials and methods

Animal grouping and tissue collection

A total of six healthy female canine puppies were obtained from local veterinary clinics and divided into two age-matched experimental groups: a 3-week-old group (n=3) and an 8-week-old group (n=3). Prior to tissue sampling, the somatic body weight of each animal was determined using an electronic precision balance, and somatic parameters were standardized according to established mammalian developmental indices.

To ensure humane tissue harvesting and complete compliance with ethical standards, the animals were subjected to a standardized pre-euthanasia sedation and deep anesthesia protocol utilizing a combination of diazepam, propofol, and ketamine hydrochloride [10]. Following the confirmation of complete loss of consciousness and reflex activity, euthanasia was performed, and the female reproductive tracts were immediately excised.

Tissue specimens from the ovaries, uterine horns, uterine body, and oviducts were carefully isolated and thoroughly rinsed in 0.9 % physiological saline solution to remove excess erythrocytes. The collected specimens were then systematically fixed in 10 % neutral buffered formalin for 48 hours at room temperature for subsequent histological and histochemical investigations.

Routine histological and histochemical processing

The study was conducted at the Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Diyala, using tissue specimens collected from healthy female puppies during the period from March to September 2025. Following fixation, the tissue samples underwent automated dehydration using a series of ascending ethanol concentrations (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, and 100 %) for two hours per station. The dehydrated specimens were cleared in xylene for two changes of one and two hours, respectively, and subsequently infiltrated with molten paraffin wax at 58–60°C for two hours.

The infiltrated tissues were embedded into paraffin blocks using a tissue embedding center. Serial sections were cut at a thickness of 5–7 µm for routine histology using a rotary microtome, mounted onto glass slides, and maintained in an incubator at 37°C for 24 hours prior to morphological staining. The fundamental parameters of tissue block sectioning and early slide incubation protocols were adapted from established comparative non-mammalian and avian upper digestive tract histomorphological models [11].

For routine morphological examination and histopathological evaluation, tissue sections from the uterine horns, body, and ovarian cortex were prepared, cleared, and stained according to standard laboratory protocols and textbooks on universal histotechniques [12]. Structural interpretations and early zonal cell identification maps were comparatively evaluated against documented reproductive histogenesis profiles of adult and pregnant domestic cats (*Felis catus*) [13]. Serial sections were also cut at 4 µm for specific histochemical evaluations. Histometrical and morphometric measurements of the uterine layers,

epithelial heights, total wall thicknesses, and primordial follicle diameters were performed using the Fiji ImageJ image analyzer software system, implementing automated pixel-to-micrometer calibration curves historically utilized in avian intestinal mucosal morphometry [14].

Histochemical characterization of secretory profiles was performed using the Periodic acid–Schiff (PAS) test to identify the expression of neutral polysaccharides and mucins within the developing genital tract and uterine glands, utilizing enzymatic and cellular degradation control methods established for complex intracellular carbohydrate screening [15]. Concurrently, Alcian blue (AB) staining at pH 2.5 was utilized to verify the presence and distribution of acidic mucopolysaccharides (mucins). Photomicrographs were captured using an Olympus digital microscope camera (Olympus, Japan).

Statistical analysis

All biometric and morphometric data were subjected to statistical analysis using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software program [16] to determine the significance of differences in study parameters between the age groups. Data were expressed as Mean $\pm$ Standard Error (SE). To evaluate the significance of variations between the two independent experimental groups (3 weeks versus 8 weeks), a two-tailed independent-samples Student's t-test was utilized. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$ and highly significant at $P < 0.01$.

Results and discussion

Histological features at three weeks of age

Histomorphological evaluation of the female reproductive system in 3-week-old canine puppies revealed distinct tissue architecture in both the ovaries

and the uterus. The ovarian cortex characteristically contained numerous clusters of primordial follicles nested within the connective tissue stroma. While individual follicles exhibited normal developmental features, signs of physiological atresia accompanied by localized collagen bundles and active fibroblasts were observed. Each primordial follicle was lined by a single layer of simple squamous follicular cells. Select oocytes within these follicles possessed distinct, spherical basophilic nuclei surrounded by a well-defined cytoplasm, whereas others exhibited nuclear regression or appeared anucleated under light microscopy. The ovarian surface was delimited by a continuous germinal epithelium composed of simple cuboidal cells, supported externally by a tunica albuginea capsular layer rich in collagen fibers.

Histological analysis of the uterine wall utilizing hematoxylin and eosin (H&E) staining demonstrated an active development of the mucosal layer. The endometrium contained multiple developing uterine glands lined by simple cuboidal epithelium, alongside newly formed glandular structures surrounded by primitive squamous cells. The lamina propria was characterized by loose connective tissue containing abundant fibroblasts. Distinct aggregations of adipocytes were identified surrounding the periphery of the uterine glands, and prominent neocapillarization was evident throughout the stromal layer (*Fig. 1*).

The endometrial mucosa was arranged into numerous complex folds lined by a prominent simple cuboidal epithelium. The functional zone of the lamina propria hosted primitive, newly formed tubular uterine glands within a matrix of loose connective tissue. Due to the extensive branching and projections of these endometrial folds, the uterine lumen characteristically assumed a distinctive stellate appearance.

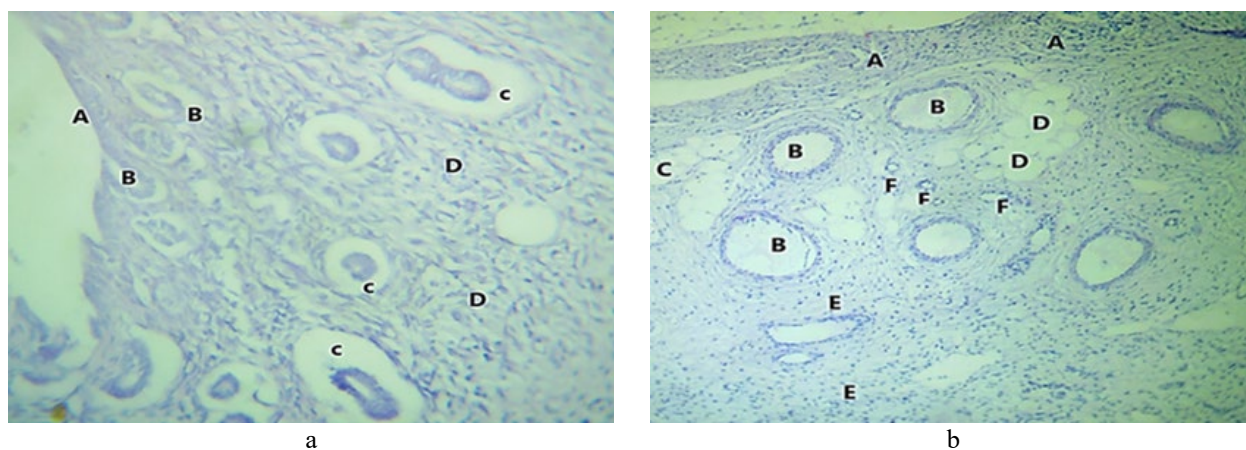


Fig. 1. Morphological features of the uterine wall in 3-week-old canine puppies (H&E staining).

- a – endometrial mucosa under higher magnification showing the simple cuboidal luminal epithelium (A); developing primitive uterine glands (B); artificial retraction spaces between the glandular epithelium and the basement membrane (C); and a dense population of stromal fibroblasts intermingled with migrating white blood cells (WBCs) within the lamina propria (D) ($\times 40$).
- b – panoramic view of the endometrium demonstrating structural collagen bundles interwoven with active fibroblasts (A); well-differentiated uterine glands lined by simple cuboidal epithelium (B); newly formed primitive glandular nests (C); interstitial adipocyte/fat cell aggregations (D); loose connective tissue stroma infiltrated by residential WBCs (E); and prominent intramural neocapillarization (F) ($\times 10$).

Histochemical and comparative findings

Histochemical analysis using Alcian blue staining revealed that a substantial number of the developing

uterine glands lacked detectable secretory products within their lumens. These glandular structures were structurally supported by dense collagen bundles

intermingled with a high density of active fibroblasts and scattered wandering white blood cells (WBCs) localized

within the deeper regions of the endometrial stroma (**Fig. 2**).

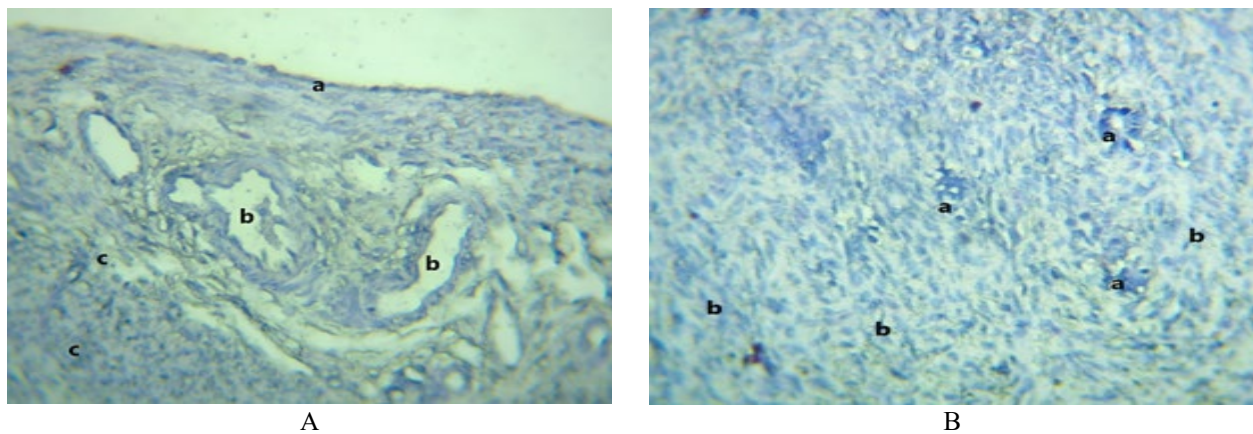


Fig. 2. Histochemical features of the uterine wall in 3-week-old canine puppies (Alcian blue staining).

A – panoramic view of the deep endometrium showing the simple cuboidal luminal epithelium (a); elongated, branching uterine glands (b) supported by prominent perfollicular collagen bundles; and a highly cellular stroma containing numerous active fibroblasts intermingled with migrating white blood cells (c) ($\times 10$).

B – higher magnification of the broad endometrial stromal layer demonstrating newly formed, primitive uterine glands (a) characterized by a low cuboidal lining and distinctly narrowed, empty lumens; randomly distributed stromal fibroblasts and collagen bundles interwoven with dense inflammatory cell infiltrates (b) ($\times 40$).

At this developmental stage, the endometrial layer appeared significantly broader, characterized by a random distribution of primitive, small uterine glands. These newly formed glands were lined by a low cuboidal epithelium and possessed distinctly narrowed lumens.

When subjected to Periodic acid–Schiff (PAS) staining to detect mucus acid polysaccharides, the uterine glands of the 3-week-old canine puppies exhibited a completely negative histochemical reaction,

demonstrating an absence of neutral mucins at this age. Concurrently, Alcian blue staining of the ovarian tissue sections at the same developmental stage highlighted a distinct simple low cuboidal germinal epithelium covering the ovarian surface. The subepithelial cortical zone contained well-defined clusters of primordial follicles characterized by spherical basophilic nuclei. These follicular cell nests were demarcated and encapsulated by prominent structural strands of collagen fibers (**Fig. 3**).

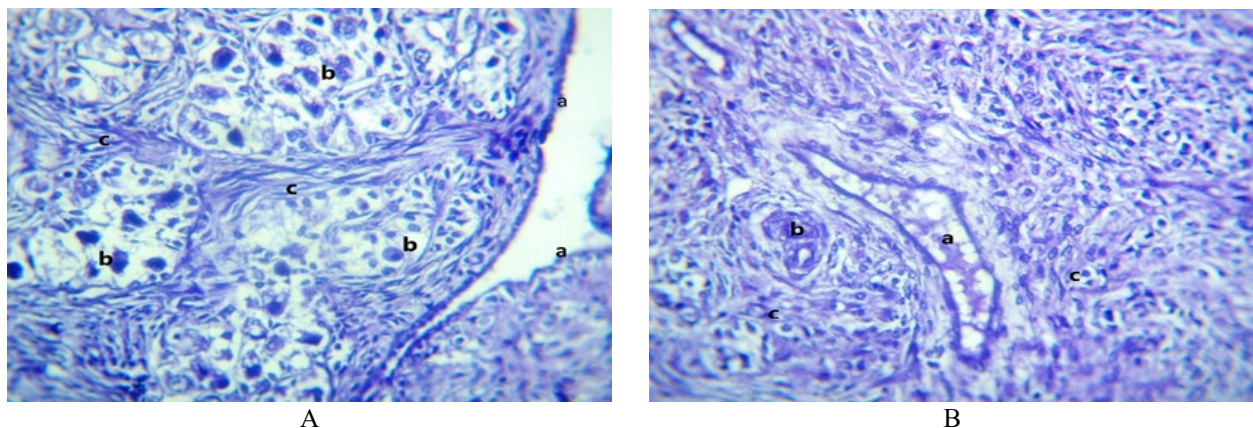


Fig. 3. Histochemical characteristics of the ovary and uterus in 3-week-old canine puppies.

A – ovarian cortex highlighted by Alcian blue staining showing the thin simple low cuboidal germinal epithelium (a) on the outer surface; distinct groups of nests containing primordial follicles (b) with spherical basophilic nuclei; and thick structural bands of collagen fibers (c) compartmentalizing the follicular nests ($\times 40$).

B – endometrial matrix subjected to Periodic acid–Schiff (PAS) staining demonstrating intense PAS-positive reaction in the basement membrane of the luminal epithelium (a); a newly formed branching uterine tubular gland (b) with a well-defined basement membrane; and residential stromal fibroblasts within the supporting connective tissue (c) ($\times 40$).

Ovarian and uterine histomorphology at eight weeks of age

Histomorphological and histochemical evaluation of the female reproductive organs in 8-week-old canine puppies demonstrated advanced tissue

differentiation. Under Periodic acid–Schiff (PAS) staining, the surface of the ovarian cortex was found to be lined by a well-defined simple cuboidal germinal epithelium. The peripheral zone of the cortex contained prominent clusters of developing primordial follicles,

each enveloped by a single layer of simple squamous follicular cells. The cortical stroma exhibited dense networks of collagen fibers intermingled with a

high density of active fibroblasts and localized white blood cell (WBC) infiltrates within the deeper cortical regions (**Fig. 4**).

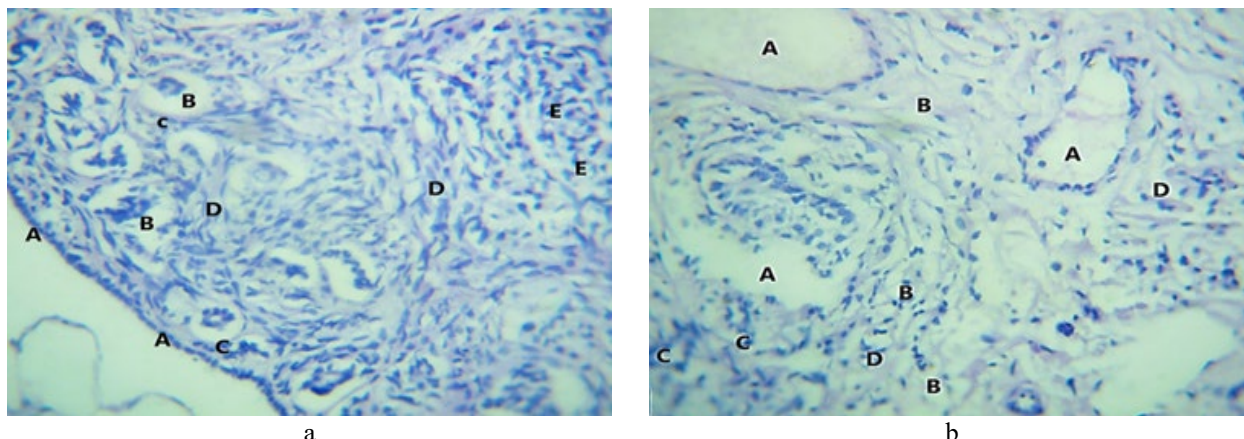


Fig. 4. Histochemical and structural features of the ovary in 8-week-old canine puppies (PAS staining)

- a – ovarian cortex demonstrating the continuous simple cuboidal germinal epithelium (A) on the outer surface; newly formed clusters of primordial ovarian follicles (B) containing basophilic nuclei and enveloped by a single layer of simple squamous follicular cells (C); dense collagen fiber bundles with fibroblasts (D); and localized white blood cell (WBC) infiltration (E) within the deeper cortical matrix ($\times 40$).
- b – ovarian medulla exhibiting prominent medullary blood vessels characteristically devoid of erythrocytes (A); a delicate structural framework of collagen fibers (B) interspersed throughout the vascular network; newly formed blood capillaries (C); and focal accumulations of residential WBCs and tissue macrophages (D) ($\times 40$).

Examination of the ovarian medulla revealed numerous prominent blood vessels, which were characteristically devoid of erythrocytes and lined by a continuous layer of flattened endothelial cells. The medullary stroma was composed of a delicate framework of collagen fibers distributed among the vascular channels, presenting noticeable WBC infiltration, scattered macrophages, and residential fibroblasts aligned with the collagenous extracellular matrix. Concurrently, histochemical analysis of the uterine wall at 8 weeks of age demonstrated that the developing uterine glands exhibited a weak positive PAS reaction, indicating the initiation of neutral mucopolysaccharide and mucus secretion within the glandular epithelium at this developmental stage.

Statistical and morphometric analysis of postnatal development

Comparative statistical analysis of the biometric parameters across different postnatal stages demonstrated significant age-dependent development in female canine puppies. The body weight of the puppies significantly increased with age, with the 8-week-old group exhibiting a highly significant increase in mean body weight (3.016 ± 0.08 g) compared to the 3-week-old group (2.128 ± 0.11 g; $P=0.0045$).

Furthermore, an evaluation of the total weight of the female reproductive tract revealed a synchronized developmental progression. A highly significant increase in reproductive system mass was documented in the 8-week-old puppies compared to the 3-week-old animals, which presented a mean reproductive tract weight of 3.104 ± 0.29 g ($P=0.0004$). These findings establish a strong positive correlation between somatic growth and the macro-morphological development of the

reproductive organs during the early postnatal period (**Table 1**).

Table 1

Effect of postnatal age on body weight and total weight of the female reproductive system in canine puppies, Mean $\pm$ SE

Age group	Body weight, g	Weight of female reproductive system, g
Week 3	2.128 ± 0.110	1.214 ± 0.130
Week 8	3.016 ± 0.083	3.104 ± 0.290
Significance	$P=0.0045$	$P=0.0004$

Note: statistically highly significant differences are observed between the age groups ($P<0.01$).

Morphometric analysis of the uterine tissue sections revealed substantial age-dependent remodeling of both the mucosal lining and the total wall thickness. The height of the uterine luminal epithelium demonstrated a highly significant increase associated with the postnatal advancement of the animals. In the 8-week-old group, the epithelial height reached a mean value of 28.50 ± 2.91 μ m, establishing a highly significant difference compared to the 3-week-old group, which presented a baseline epithelial height of 5.50 ± 0.93 μ m ($P=0.0001$).

Conversely, an inverse morphometric trend was documented regarding the total wall thickness of the uterus. The total uterine wall thickness was significantly greater in the 3-week-old puppies, presenting a mean value of 447.40 ± 53.45 μ m. In contrast, the 8-week-old group exhibited a significantly reduced wall thickness, averaging 271.30 ± 40.45 μ m ($P=0.0303$). This structural thinning of the uterine wall, occurring concurrently with the vertical hypertrophy of the luminal epithelium, reflects intensive longitudinal elongation and regional architectural reorganization of the myometrium and

endometrium during this specific phase of early postnatal organogenesis (**Table 2**).

Table 2
Effect of postnatal age on luminal epithelial height and total wall thickness of the uterus in canine puppies, Mean±SE

Age group	Epithelial height, μm	Total wall thickness, μm
Week 3	5.50±0.93	447.40±53.45
Week 8	28.50±2.91	271.30±40.45
Significance	P=0.0001	P=0.0303

Note: statistically significant difference (P<0.05); Statistically highly significant difference (P<0.01).

Morphometric investigation of the oviduct structures demonstrated architectural alterations in total wall thickness alongside structural stability in the mucosal

Table 3
Effect of postnatal age on luminal epithelial height, total wall thickness of the oviduct, and primordial follicle diameter in canine puppies, Mean±SE

Age group	Oviductal epithelial height, μm	Oviductal total wall thickness, μm	Primordial follicle diameter, μm
Week 3	10.00±1.76	220.00±29.74	27.50±1.20
Week 8	11.90±1.53	133.50±4.71	34.00±1.85
Significance	P=0.4407 (NS)	P=0.0207	P<0.05

Note: NS = non-significant (P>0.05). Statistically significant difference (P<0.05).

Concurrently, morphometric assessment of the ovarian tissue sections revealed steady growth dynamics in the early stages of oogenesis, with the mean diameter of the primordial follicles significantly expanding from 27.50±1.20 μm at 3 weeks to 34.00±1.85 μm at 8 weeks of age (P<0.05).

The canine female reproductive tract encompasses the paired ovaries, which serve as the primary oocyte reservoir, alongside the tubular genital ducts including the bi-cornuate uterus, a small uterine body, and the oviducts. During early postnatal ontogenesis, circulating gonadotropin and ovarian steroid levels characteristically exhibit low, irregular profiles, actively modulating both the biochemical microenvironment and structural properties of these developing tissue layers.

In the current study, morphometric and histochemical tracking of the canine reproductive organs revealed distinct chronological remodeling. At 3 weeks of age, the ovarian cortex contained prominent clusters of primordial follicles enclosed by supporting collagen bundles. While individual follicles presented normal morphology, signs of physiological atresia accompanied by nuclear regression were observed, with the primordial follicles exhibiting a negative histochemical reaction under PAS staining. These baseline cortical observations closely align with the developmental chronologies documented in historical canine studies [17]. Physiologically, while prenatal oogenesis establishes the initial oogonial pool, subsequent folliculogenesis occurs primarily postnatally. Prior to partus, the mammalian ovary hosts mitotic oogonial nests, whereas well-defined primordial follicles systematically become apparent within the first two to three weeks of postnatal life.

Concurrently, the uterine wall at 3 weeks of age demonstrated an active mucosal expansion, characterized

by complex endometrial folds lined by a prominent simple cuboidal epithelium. The supporting lamina propria hosted primitive, newly formed tubular uterine glands within a loose connective tissue matrix, creating a distinctive stellate intraluminal appearance. These structural configurations are consistent with classical observations on early mammalian endometrial histogenesis [18]. In comparison to other domestic species, distinct inter-specific variations exist regarding the timeline of postnatal uterine organogenesis. In heifers, uterine development progresses continuously up to the sixth month of life before entering a relative resting phase. In domestic pigs, the uterine wall is characteristically devoid of differentiated uterine glands and exhibits a negative estrogen receptor-alpha profile at birth; however, intense glandular differentiation and stromal maturation are initiated within the first two weeks of postnatal life [19]. These comparative data highlight that pre-pubertal uterine growth dynamics, driven by structural tissue remodeling, reach peak intensity between the third and sixth months across distinct mammalian taxa.

In contrast, the height of the oviductal luminal epithelium remained highly stable between the two developmental stages. No statistically significant differences were observed in epithelial height between the 3-week-old and 8-week-old groups, with the morphometric values demonstrating statistical homogeneity (10.00±1.76 μm versus 11.90±1.53 μm , respectively; P=0.4407, NS; **Table 3**).

Furthermore, the surge of circulating gonadal hormones during the late pre-pubertal phase exerts a profound structural impact on the mammalian uterine wall. These chronological tissue modifications closely correspond with reproductive research conducted on rodents [20]. This complex sequence of synchronized morphogenetic and cytodifferentiative processes establishes the primary foundation for definitive tissue functionality in maturity. In all female mammals, endometrial glands are fundamentally responsible for the synthesis, secretion, and transport of a complex histotrophic mixture of macromolecules required for pre-implantation embryo maintenance [21]. In addition to

serving as a crucial lubrication barrier, the intraluminal mucus hydrates the mucosal surface, prevents bacterial adhesion, and restricts pathogenic colonization, protecting the lining from localized chemical and physical harm.

In the current investigation, the functional initiation of this glandular activity was tracked utilizing PAS staining for neutral mucus polysaccharide secretion. The histochemical reaction was completely negative in the 3-week-old canine puppies, whereas a weak positive PAS reaction emerged within the uterine glands by the 8th week of postnatal life. This chronological onset of secretory maturation strongly agrees with historical baselines on early canine glandular differentiation [22]. In comparison to adult cyclical mammals, these early postnatal profiles represent the primitive stages of glandular development. During the luteal phase of the human menstrual cycle, the uterine luminal epithelium and glandular cells exhibit a robust increase in PAS-positive neutral carbohydrates and acidic mucin glycoproteins. Similarly, the intensity of the PAS reaction within the uterine epithelium of adult goats fluctuates dynamically from moderate to high density during proestrus, estrus, and diestrus, declining significantly during metestrus [23]. Conversely, in adult cows, both the glandular epithelial cells and the luminal lining characteristically lack carboxylated acid mucins. This comparative matrix underscores that the weak positive PAS reaction observed in our 8-week-old puppies marks the precise physiological transition toward active, mature mucopolysaccharide synthesis.

The biometric and morphometric alterations documented in the current study underscore a synchronized progression of early postnatal reproductive development. The highly significant increase in somatic body weight (from 2.128 ± 0.110 g to 3.016 ± 0.083 g) and total reproductive tract mass (from 1.214 ± 0.130 g to 3.104 ± 0.290 g) between the 3rd and 8th weeks of life demonstrates a tight correlation between systemic somatic growth and reproductive organogenesis, which is consistent with early mammalian developmental indices [18]. These findings support the consensus that endogenous ovarian steroidogenesis exerts a primary regulatory influence on subsequent uterine and stromal modifications, while minor fluctuations in body mass play a secondary role. Furthermore, any early exposure to exogenous hormonal disruption, such as the administration of systemic steroids during the initial postnatal weeks, is known to induce severe structural and biochemical defects in endometrial maturation, permanently compromising future fertility [24].

Morphometrically, the highly significant increase in uterine luminal epithelial height (from 5.50 ± 0.93 μ m to 28.50 ± 2.91 μ m) observed in the 8-week-old group represents vertical cellular hypertrophy linked to active mucosal differentiation. Conversely, the total uterine wall thickness exhibited a significant reduction over the same period (decreasing from 447.40 ± 53.45 μ m to 271.30 ± 40.45 μ m). This structural pattern strongly agrees with historical observations on pre-pubertal mammalian uterine remodeling [25], reflecting intensive longitudinal

elongation and mechanical stretching of the organ wall as the uterine horns expand during early ontogenesis.

A mirror morphometric trend was recorded within the tubular genital ducts. The total wall thickness of the oviduct decreased significantly from 220.00 ± 29.74 μ m at 3 weeks to 133.50 ± 4.71 μ m at 8 weeks ($P=0.0207$), driven by the same mechanism of regional longitudinal tissue expansion. Concurrently, the height of the oviductal luminal epithelium maintained statistical homogeneity ($P=0.4407$), proving that the functional inner lining remains cytologically stable during this rapid macro-morphological stretching phase. Synchronously, the mean diameter of the primordial ovarian follicles demonstrated a steady physiological enlargement, expanding significantly from 27.50 ± 1.20 μ m to 34.00 ± 1.85 μ m by the 8th week of age. This steady growth dynamic is compatible with established folliculogenesis profiles [26], indicating that early pre-antral follicle formation and initial oocyte expansion progress as an age-dependent physiological process, independent of external environmental or energetic variations, preparing the ovarian cortex for subsequent pubertal recruitment.

Conclusions

In conclusion, the early postnatal organogenesis of the canine female reproductive tract between the third and eighth weeks of life is driven by distinct, synchronized tissue remodeling characterized by highly targeted morphometric shifts rather than uniform growth. The functional maturation of the endometrium is confirmed by a histochemical transition of neutral mucopolysaccharides within the uterine glands from a completely negative reaction to a distinct weak positive profile under PAS staining. Morphometrically, the uterine wall exhibits a highly significant, more than 5-fold ($5.2\times$) vertical hypertrophy of the luminal epithelium ($P=0.0001$). Concurrently, intense longitudinal organ elongation and regional tissue stretching result in a 39.4 % reduction in total uterine wall thickness ($P=0.0303$) and a 39.3 % reduction in total oviductal wall thickness ($P=0.0207$) during early tubular expansion. In contrast to the strict cytological stability maintained by the oviductal luminal epithelium ($P=0.4407$), the functional ovarian cortex demonstrates a steady, age-dependent folliculogenesis progression manifested by a 23.6 % linear expansion of the primordial follicle diameter ($P<0.05$), thereby establishing crucial relative biophysical and histochemical baselines for the evaluation of early reproductive development in canine females.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The authors confirm that all experimental procedures, husbandry protocols, and studies involving biological objects were planned and conducted in strict accordance with the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1986), Directive 2010/63/EU, national ethical norms, and international standards for the humane treatment of animals (NIH,

ARRIVE). The research protocol and experimental scheme were officially reviewed and approved by the Scientific Ethical Committee of the College of Veterinary Medicine, University of Diyala, Iraq (Approval No. Vet Medicine 217 dated September 2025). To minimize animal stress, discomfort, and suffering, all handling, maintaining, and subsequent tissue sampling procedures involving canine subjects were executed in strict compliance with standard veterinary guidelines, recommendations of the American Veterinary Medical Association (AVMA), and current international principles of animal welfare.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The authors state that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors strongly acknowledge the Council of the College of Veterinary Medicine at Diyala University for their continuous support and for providing the necessary institutional facilities to successfully conduct this research project.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The authors declare that generative artificial intelligence (AI) and AI-assisted technologies were utilized strictly to improve the readability and language editing of the manuscript. No new content, clinical data, or scientific interpretations were introduced during this process. The authors have fully reviewed, verified, and revised all generated outputs and remain solely responsible and accountable for the accuracy, originality, and scientific integrity of all content within the manuscript. Furthermore, the AI technology was not utilized as a co-author and does not qualify for authorship.

References

- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351(6322), 117–121. <https://doi.org/10.1038/351117a0>
- Kobayashi, A., & Behringer, R. R. (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature Reviews Genetics*, 4(12), 969–980. <https://doi.org/10.1038/nrg1225>
- Dressler, G. R. (2006). The cellular basis of kidney development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 509–529.
- Roly, Z. Y., Backhouse, B., Cutting, A., Tan, T. Y., Sinclair, A. H., Ayers, K. L., Major, A. T., & Smith, C. A. (2018). The cell biology and molecular genetics of Müllerian duct development. *WIREs Developmental Biology*, 7(3), e310. <https://doi.org/10.1002/wdev.310>
- Cooke, P. S., Borsdorf, D. C., Ekman, G. C., Doty, K. F., Clark, S. G., Dziuk, P. J., & Bartol, F. F. (2012). Uterine gland development begins postnatally and is accompanied by estrogen and progesterone receptor expression in the dog. *Theriogenology*, 78(8), 1787–1795. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.028>
- Šťastná, D., & Šťastný, P. (2018). The morphological changes of uterus in postnatal development of heifers. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 21(2), 52–59. <https://doi.org/10.15414/afz.2018.21.02.52-59>

- Abiaezute, C. N., & Nwaogu, I. C. (2015). Postnatal development of the vagina in West African dwarf goat (*Capra hircus*). *Journal of Cell and Animal Biology*, 9(4), 31–37.
- Orel, E., Ciglenecki, I., Thiabaud, A., Temerev, A., Calmy, A., Keiser, O., & Merzouki, A. (2023). An automated literature review tool (LiteRev) for streamlining and accelerating research using natural language processing and machine learning: Descriptive performance evaluation study. *Journal of Medical Internet Research*, 25, e39736. <https://doi.org/10.2196/39736>
- Chawla, S., Jena, S., & Nayak, S. (2021). The laboratory Guinea pig. In *Essentials of Laboratory Animal Science: Principles and Practices* (pp. 239–251). Springer, Singapore.
- Atiyah, A. A. (2014). Evaluation of general anesthesia induced by propofol, ketamine protocol in rabbits premedicated with diazepam. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 38(2), 100–107. <https://doi.org/10.30539/iraqijvm.v38i2.230>
- Naser, R. A. A., Al-Redah, S. A. A., Ahmed, E. S., Zghair, F. S., & Al-Ezzy, A. I. A. (2024). Comparative anatomy, histology, histochemistry, and immunohistochemistry of the esophagus in ostrich (*Struthio camelus*) and turkey (*Meleagris gallopavo*). *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 12(7), 1341–1347. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2024/12.7.1341.1347>
- Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2018). *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. Elsevier Health Sciences.
- AL-Harbawy, R. M. A., & Abood, D. A. (2024). A comparative histological, histometrical and hormonal study between the ovary and uterus of non-pregnant and pregnant local breed cat (*Felis catus*). *University of Thi-Qar Journal of Agricultural Research*, 13(1), 234–249. <https://doi.org/10.54174/yx2aw115>
- Suad, Kh. A., Al-Shamire, J. S. H., & Dhyaa, A. A. (2018). Histological and biochemical evaluation of supplementing broiler diet with β -hydroxy-methyl butyrate calcium (β -HMB-Ca). *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19(1), 27–34.
- Tolosa, E., Li, W., Yasuda, Y., Wienhold, W., Denzin, L. K., Lautwein, A., Driessen, C., Schnorrer, P., Weber, E., Stevanovic, S., Kurek, R., Melms, A., & Brömme, D. (2003). Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *Journal of Clinical Investigation*, 112(4), 517–526. <https://doi.org/10.1172/jci200318028>
- George, D., & Mallery, P. (2019). *IBM SPSS Statistics 26 step by step: A simple guide and reference*. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780429056765>
- Andersen, A. C., & Simpson, M. E. (1974). The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). *Theriogenology*, 1(1), 39–42. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(74\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0093-691x(74)90062-4)
- Yan, W., Chen, J., Wiley, A. A., Crean-Harris, B. D., Bartol, F. F., & Bagnell, C. A. (2008). Relaxin (RLX) and estrogen affect estrogen receptor α , vascular endothelial growth factor, and RLX receptor expression in the neonatal porcine uterus and cervix. *Reproduction*, 135(5), 705–712. <https://doi.org/10.1530/rep-08-0014>
- Tarleton, B. J., Wiley, A. A., Spencer, T. E., Moss, A. G., & Bartol, F. F. (1998). Ovary-independent estrogen receptor expression in neonatal porcine endometrium. *Biology of Reproduction*, 58(4), 1009–1019. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.4.1009>
- Desjardins, C., Macmillan, K. L., & Hafs, H. D. (1968). Reproductive organ DNA and RNA of male and female rats from birth to 100 days of age. *The Anatomical Record*, 161(1), 17–22. <https://doi.org/10.1002/ar.1091610102>
- Pluta, K., Irwin, J. A., Dolphin, C., Richardson, L., Fitzpatrick, E., Gallagher, M. E., Reid, C. J., Crowe, M. A., Roche, J. F., Lonergan, P., Carrington, S. D., & Evans, A. C. O. (2011). Glycoproteins and glycosidases of the cervix during the periestrous period in cattle. *Journal of Animal Science*, 89(12), 4032–4042. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4187>
- Bagade, P. S., Mugale, R. R., Thakur, P. N., & Kapadnis, P. J. (2018). Histological study of uterus in Osmanabadi goat. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 7(4), 1311–1315.
- Dean, M. (2019). Glycogen in the uterus and fallopian tubes is an important source of glucose during early pregnancy. *Biology of Reproduction*, 101(2), 297–305. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz102>

24. Honaramooz, A., Aravindakshan, J., Chandolia, R. K., Beard, A. P., Bartlewski, P. M., Pierson, R. A., & Rawlings, N. C. (2004). Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. *Animal Reproduction Science*, 80(1-2), 15–29. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00136-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00136-2)
25. Farouk, S. M., & Kamel Osman, A.-H. (2012). Histogenesis of the vagina of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*): Morphological evidence of the histochemical aspects. *Cell & Developmental Biology*, 01(03), 105. <https://doi.org/10.4172/2168-9296.1000105>
26. Chelikani, P. K., Ambrose, J. D., & Kennelly, J. J. (2003). Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty, and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. *Theriogenology*, 60(4), 707–725. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00088-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00088-8)

ORCID

N. M. Ahmed 
N. A. S. Younis 
R. A. A. Naser 

<https://orcid.org/0009-0006-3357-9129>
<https://orcid.org/0009-0001-3728-4276>
<https://orcid.org/0000-0003-3153-3232>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Phenotype detection of biofilm from *Serratia* and *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis of bovine in Diyala governorate

S. R. Abdulhussain | R. A. Hussein | M. A. Hasan

Article info

Correspondence Author

S. R. Abdulhussain

E-mail:

roaa.a@uodiyala.edu.iq

College of Veterinary
Medicine, University of
Diyala,
Al-Muradia, Old Baghdad-
Baqubah Road, Baqubah,
32001, Diyala, Iraq

Citation: Abdulhussain, S. R., Hussein, R. A., & Hasan, M. A. (2026). Phenotype detection of biofilm from *Serratia* and *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis of bovine in Diyala governorate. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 150–160. doi: 10.31210/spi2026.29.02.22

Persistent intramammary infections caused by biofilm-producing bacterial pathogens represent a critical challenge for dairy cattle health and veterinary management. This research aimed to isolate *Staphylococcus aureus* and *Serratia marcescens* from clinical and subclinical bovine mastitis cases in Baqubah city within the Diyala governorate, evaluate their phenotypic and genotypic biofilm-forming profiles, and determine their susceptibility to *Capsicum frutescens* crude ethanolic extract. Out of 65 milk samples collected from lactating dairy cows exhibiting evident symptoms of mastitis, bacterial pathogens were successfully recovered from 58 samples, representing a 89.23 % isolation success rate, whereas 7 samples exhibited no pathogen development. Based on standard morphological characterization, conventional biochemical profiling, and definitive verification via the automated VITEK 2 identification system, 10 isolates were classified as *Staphylococcus aureus*, constituting 15.38 % of the total specimens, and 4 isolates were identified as *Serratia marcescens*, accounting for 6.15 % of the evaluated sample pool. Phenotypic quantification of biofilm production using the microtiter plate assay method revealed that among the 10 staphylococcal strains, 3 isolates (30 %) developed weak biofilms, 3 isolates (30 %) generated moderate biofilms, and 4 isolates (40 %) established strong, highly adherent biofilm architectures. For the 4 *Serratia marcescens* environmental-opportunistic strains, 1 isolate (25 %) exhibited moderate biofilm layers, while the remaining 3 isolates (75 %) demonstrated robust, strong biofilm matrix development. Molecular characterization via the Polymerase Chain Reaction verified the presence of the multidrug efflux pump gene *norA* at 391 bp in ciprofloxacin-resistant staphylococcal strains and the biofilm-associated genetic marker *bsmA* at 298 bp in *Serratia marcescens* strains. Evaluation of the alternative antibacterial efficacy of the crude *Capsicum frutescens* extract using the agar well diffusion assay at targeted concentrations of 500 and 1000 µg/mL demonstrated profound, dose-dependent inhibitory activity against both persistent bacterial pathogens, with the measured diameters of the inhibition zones expanding proportionally in direct correlation to the rising concentration of the agent. These findings confirm that biofilm matrix production directly accelerates chronic disease development and long-term bovine mastitis persistence within the region, establishing the crucial practical utility of implementing alternative biofilm-targeted control programs and natural phytotherapeutic alternatives in dairy herds.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, bovine mastitis, biofilm formation, *Capsicum frutescens*.

Фенотипове визначення біоплівки *Serratia* та *Staphylococcus aureus*, виділених від великої рогатої худоби з клінічним та субклінічним маститом у провінції Діяла

С. Р. Абдулхуссейн | Р. А. Хуссейн | М. А. Хасан

Факультет ветеринарної
медицини, Університет
Діяли,
м. Баакуба, Ірак

Хронічні внутрішньовименні інфекції, спричинені бактеріальними патогенами, що утворюють біоплівки, становлять серйозну проблему для здоров'я великої рогатої худоби та ветеринарного менеджменту. Це дослідження було спрямоване на ізоляцію штамів *Staphylococcus aureus* та *Serratia marcescens* у випадках клінічного та субклінічного маститу корів у місті Бакуба в провінції Діяла, оцінку фенотипових та генотипових профілів утворення біоплівки, а також визначення їхньої чутливості до неочищеного етанольного екстракту *Capsicum frutescens*. Із 65 зразків молока, відібраних від лактуючих молочних корів із очевидними симптомами маститу, бактеріальні патогени були успішно виділені з 58 зразків, що становить 89,23 %, тоді як 7 зразків не продемонстрували росту патогенів. На основі стандартної морфологічної характеристики, загальноприйнятого біохімічного профілювання та остаточного підтвердження за допомогою автоматизованої системи ідентифікації VITEK 2 10 ізолятів було класифіковано як *Staphylococcus aureus*, що становить 15,38 % від загальної кількості зразків, а 4 ізоляти було ідентифіковано як *Serratia marcescens*, що становить 6,15 % досліджуваних зразків. Фенотипове кількісне визначення утворення біоплівки за допомогою методу мікротитраційного планшета показало, що серед 10 стафілококових штамів 3 ізоляти (30 %) утворювали слабкі біоплівки, 3 ізоляти (30 %) продемонстрували помірне утворення біоплівки, і 4 ізоляти (40 %) сформували сильні, високоадгезивні архітектури біоплівки. Серед 4 умовно-патогенних штамів *Serratia marcescens* 1 ізолят (25 %) виявив помірне утворення біоплівки, тоді як інші 3 ізоляти (75 %) продемонстрували інтенсивний розвиток матриксу біоплівки. Молекулярна характеристика за допомогою полімеразної ланцюгової реакції підтвердила наявність гена мультирезистентного ефлюксного насоса *norA* розміром 391 пар нуклеотидів у ципрофлоксацинорезистентних стафілококових штамів та генетичного маркера біоплівки *bsmA* розміром 298 пар нуклеотидів у штамів *Serratia marcescens*. Оцінка антибактеріальної ефективності неочищеного екстракту *Capsicum frutescens* методом дифузії в агарі у цільових концентраціях 500 та 1000 мг/мл продемонструвала виражену дозозалежну інгібуючу активність проти обох хронічних бактеріальних патогенів, при цьому виміряні діаметри зон пригнічення росту розширювалися пропорційно до збільшення концентрації екстракту. Отримані результати підтверджують, що утворення матриксу біоплівки безпосередньо сприяє розвитку хронічного захворювання та тривалому перебігу маститу великої рогатої худоби в регіоні, що вказує на важливу практичну доцільність впровадження альтернативних програм контролю, спрямованих на біоплівки, а також на застосування природних фітотерапевтичних засобів у молочних господарствах.

Ключові слова: *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, мастит великої рогатої худоби, утворення біоплівки, *Capsicum frutescens*.



Бібліографічний опис для цитування: Абдулхуссейн С. Р., Хуссейн Р. А., Хасан М. А. Фенотипове визначення біоплівки *Serratia* та *Staphylococcus aureus*, виділених від великої рогатої худоби з клінічним та субклінічним маститом у провінції Діяла. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 150–160.

Introduction

Bacterial pathogens exist throughout the dairy cow environment which creates a danger for mammary gland health [1]. The collection of mastitis-positive cow milk samples revealed more than 130 distinct microorganisms which consisted mainly of bacterial species. The primary pathogens consist of contagious bacteria which include *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* and environmental bacteria which consist of coliforms and various streptococcal species found in natural surroundings [2].

The mastitis condition develops because of three particular types of *Serratia* bacteria which include *S. marcescens*, *S. rubidaea* and *S. liquefaciens*. The dry period stands as the main stage which leads to infection, secondly the lactation phase. The source of the outbreak remained unidentified during the *Serratia* mastitis outbreak which probably resulted from bacterial growth inside teat dip containers and bedding materials. The occurrence of mastitis becomes more likely when cows experience unclean environments and when their teat ends sustain damage. The environmental microorganism *Serratia* becomes transmitted through the milking machine according to reference [3].

Mastitis is a multifactorial and clinically complex inflammatory condition affecting the mammary gland parenchyma. The disease develops from multiple damaging factors which include pathogenic microorganisms as the main cause and physical injuries and chemical exposures that trigger the disease. The teat and udder tissue must first experience damage before microbes can enter the gland to cause an infection.

Staphylococcus aureus represents one of the main pathogens because it infects numerous animal species while producing various infections throughout different body regions. The bacteria can colonize various surfaces because it possesses multiple virulence factors which include specific adhesion molecules and biofilm production capabilities on living and non-living surfaces [4].

Environmental pollutants now serve as the main factor which causes bovine mastitis through their impact on *Serratia* species that consist of *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens* members. Scientists have proven that these organisms exist throughout every environmental space because they exist in water and soil and they can be found on plants and inside insects which distribute them [5].

The presence of *Serratia* spp. in dairy operations becomes evident through their detection in bedding materials and milking equipment and bovine fecal matter while bulk tank milk surveys show their existence in 1.3 % to 2 % of cases [6]. The bacteria form biofilms on production equipment which creates a major danger to milk quality because their enzymes persist through pasteurization and lead to milk spoilage during both processing and storage operations [7].

Bovine mastitis serves as the leading economic disease which threatens the global dairy sector because it triggers mammary gland inflammation in cows. The financial burden stems primarily from depressed milk

yields, deterioration in milk composition, and elevated expenditures on veterinary interventions [8].

Veterinary clinicians diagnose the disease through two primary clinical patterns which it presents. Mastitis in its clinical form produces milk alterations which include color changes and floating clumps and solid masses, while the udder becomes swollen and red and develops touch sensitivity. The glandular tissue develops fibrotic tissue through a process of remodeling which occurs in severe or long-lasting cases [7, 9].

The clinical presentation of subclinical mastitis remains hidden because the disease does not show any visible symptoms, which makes it necessary to use diagnostic tools such as the California Mastitis Test (CMT) for detection. During mastitis, the inflammatory response leads to an influx of somatic cells into the milk, increasing its pH and often causing a change in color, which can range from yellowish to watery or even reddish in severe cases, indicating the extent of inflammation and tissue damage [9].

The aim of the study

The objectives of this study were to identify the prevalence of *Staphylococcus aureus* and *Serratia marcescens* in clinical and subclinical mastitis cases in Diyala governorate and to assess their biofilm-forming capabilities, which contribute significantly to the persistence and recalcitrance of these infections.

Materials and methods

Milk sample collection

Veterinary experts examined the cow's udder together with its teat to identify any clinical mastitis symptoms. The researchers conducted visual inspections and manual udders palpation of their study cows to detect clinical mastitis symptoms. The examination process focused on five essential inflammation signs which include redness and swelling and pain and hotness and functional loss, and also evaluated udder quarter dimensions and their texture. The milk underwent inspection to identify clinical mastitis indicators through its color and its texture and its clot formation characteristics.

Milk specimens were collected from sixty-five dairy cattle which showed clinical signs of mastitis throughout Diyala governorate while researchers used strict aseptic procedures to prevent any outside contamination during the sample collection process [3].

The California Mastitis Test (CMT) functioned as the first diagnostic tool which detected subclinical diseases while providing the benefit of instant testing at the cow's location. The assay is performed by admixing equivalent aliquots of milk from individual quarters with the supplied reagent within a compartmentalized four-well paddle. The reagent functions through detergent-based cell destruction which breaks down somatic cells to release their nuclear DNA while developing into a gel-like structure; bromocresol purple serves as the standard pH-based indicator to help users identify color differences [9].

The resultant degree of gelation provides a semi-quantitative approximation of the somatic cell count, thereby reflecting the severity of underlying udder

inflammation. Conversely, milk from unaffected glands – possessing a physiological pH near 6.6 – yields a mixture that typically persists in a liquid state with a characteristic purple-to-blue-gray coloration. However, in mastitic milk, the increased pH due to inflammation causes the indicator to turn a deeper purple, while a yellow color, though less common, can indicate an acidic shift often associated with acute coliform mastitis. The visual assessment of both gelling and color change allows for a semi-quantitative scoring of mastitis severity, enabling differentiation between healthy, subclinical, and clinical cases [9].

Researchers acquired 65 milk samples from cows which developed clinical mastitis symptoms during their lactation period in Baqubah city and its surrounding areas. The research team took milk samples from animal quarters which showed infection, but the animals had not received any form of antibiotic treatment in the past. The collection procedure adhered to strict aseptic protocols: the udder surface was cleansed with water, after which teats and teat orifices were swabbed with 70 % ethyl alcohol-soaked cotton wool and allowed to dry using fresh sterile gauze prior to milking out the sample.

Researchers collected 5–6 milliliters of milk from the infected quarter through sterile bottle collection after they removed the initial foremilk for bacteriological testing and they properly labeled the samples. The samples reached the Veterinary laboratory microbiology facility through quick transportation after staff members put them in ice containers which contained frozen ice packs. The samples which did not receive immediate processing were preserved in a 4°C refrigerator until scientists could begin their work (up to 48 hours).

Bacterial isolation and identification

Scientists used various media types to isolate different bacterial species from their samples. The research team used MacConkey agar and Mannitol salt agar as their standard media throughout their study. The laboratory analysis media were prepared using the standard procedures which recommended for this purpose [10].

Laboratory personnel used standard morphological and biochemical testing methods to identify bacteria during their isolation process according to the *Manual of Clinical Microbiology* [11]. In addition, VITEK 2 system was used to confirm each isolate.

Biofilm assay

The quantitative assessment of biofilm production was performed according to a modified microtiter plate protocol [12], with the following sequential steps:

1. Preparation of inoculum: Laboratory personnel extracted individual colonies from fresh agar plates to create a suspension which they combined with 5 mL brain heart infusion broth containing 2 % sucrose before incubating it at 37°C under aerobic conditions for 24 hours [13].

2. Plate inoculation: Laboratory personnel used 20 µL of bacterial suspension from each isolate which they adjusted to 0.5 McFarland opacity to fill individual wells in a 96-well microplate that contained 180 µL of BHI broth. The plate received an incubation period of 24 hours

at 37°C through static incubation after it was covered following inoculation.

3. Washing: Following incubation, planktonic cells were eliminated by three successive rinses with physiological saline (0.9 % NaCl).

4. Fixation: Surface-attached biofilms were fixed by adding 200 µL of absolute methanol per well for 15 minutes, then air-dried for 30 minutes.

5. Staining: Biofilm biomass was visualized by adding 200 µL of 1 % crystal violet solution to each well for 15 minutes.

6. Destaining and quantification: Unbound dye was aspirated, wells were gently washed with sterile distilled water, and captured stain was eluted with 96 % ethanol. The automated microplate reader monitored optical density at 630 nm while following the classification standards listed in *Table 1*.

Table 1

Classification criteria for bacterial biofilm adherence based on optical density values at 630 nm

Optical density	Biofilm-forming capacity
OD ≤ OD _c	Non-adherent (Non-producer)
OD _c < OD ≤ 2OD _c	Weak producer
2OD _c < OD ≤ 4OD _c	Moderate producer
OD > 4OD _c	Strong producer

Plant collection and extraction

Red hot peppers (*Capsicum frutescens*) which originated from Iraq were purchased at Baghdad markets before laboratory staff members performed two consecutive water rinses to eliminate dirt and foreign substances from the peppers. The process of drying fruits required the whole fruits to be cut into small pieces which then dried at room temperature until they reached stable weight. The dried pepper segments were subsequently pulverized into a homogeneous powder, which was then placed in a 500 mL borosilicate beaker.

The extraction process required 100 g of dried powder which was combined with 300 mL of absolute ethanol before being stirred with a magnetic stirrer at room temperature for seven days. The suspension underwent vacuum filtration at the end of extraction time before the clear filtrate was concentrated through room temperature evaporation to produce a thick brown substance which scientists saved for upcoming research [14].

Evaluation of antibacterial activity

The antibacterial activity of the prepared extract samples was evaluated using the agar well diffusion assay, with the following procedural steps:

1. Each bacterial isolate received 18 to 24 hours of growth in nutrient broth at 37°C before reaching the exponential growth phase.

2. Standardization: Laboratory personnel combined one microbial colony with 5 mL of sterile saline which they then adjusted to produce a 0.5 McFarland standard equivalent to $\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL.

3. Plate inoculation: The adjusted bacterial suspension was streaked across the entire surface of Mueller-Hinton agar using a sterile cotton swab; plates were allowed to rest undisturbed for ten minutes prior to well formation.

4. Sample loading: Laboratory personnel created 5 mm diameter wells in the agar, then they used a micropipette to distribute 0.1 mL of each extract sample into distinct wells.

5. The plates which had been loaded underwent an 18-hour incubation at 37°C before laboratory personnel measured and recorded the sizes of the inhibition zones which appeared.

Molecular detection of biofilm-associated genes

The existence of biofilm genes (*norA*) for *Staphylococcus aureus* and (*bsmA*) for *Serratia marcescens* were examined in two isolates for each bacteria. DNA extraction was carried out following a G-spin™ extraction kit (iNtRON, Korea). The primers employed for determining genes are documented in **Table 2**.

Table 2

Oligonucleotide primer sequences employed for the detection of *norA* and *bsmA* biofilm-associated genes

Target gene	Primer	Sequence (5' → 3')	Size of amplicon (bp)
<i>norA</i>	F	TTTCATATGATCAATCCCCTTT	391
	R	ACCACCAAACGGCGATATAA	
<i>bsmA</i>	F	CGTTTGTCGCGACACTCAT	298
	R	TACAGGATCGCCTGGGAATA	

A total volume of 20 µl was used to establish the reaction mixtures. Specifically, 2 µl of DNA extracted from the isolates was added to 8 µl of the master mix

(Bioneer, USA), 0.5 µl of magnesium chloride (MgCl₂), and 7.5 µl of deionized water (ddH₂O). After that, 2 µl of both primers was added to the resultant mixture and then placed in the thermocycler (Biomatra, Germany) for 5 minutes at 94°C. PCR programs for detecting respective genes are represented in **Table 3**.

Table 3

Optimized thermocycling protocols and conditions for targeted amplification of biofilm-associated determinants

Step	Temperature (°C)	Time	Cycles
Initial denaturation	94 °C	5 min	1
Denaturation	94 °C	30 sec	35
Annealing	55 °C	30 sec	35
Extension	72 °C	30 sec	35
Final extension	72 °C	5 min	1

The PCR products were stained with RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Korea), 1 % agarose gel (Merck, Darmstadt, Germany) electrophoresis, and photographed under UV light. Images were digitally captured using the Gel Doc apparatus.

Results and discussion

Field manifestations and California Mastitis Test profile

Clinical examination of the dairy cows revealed distinct pathological changes indicating active infections. Affected quarters exhibited notable local inflammation and structural swelling of the udder parenchyma, which signified typical clinical manifestations associated with bovine mammary gland disease (**Fig. 1**).

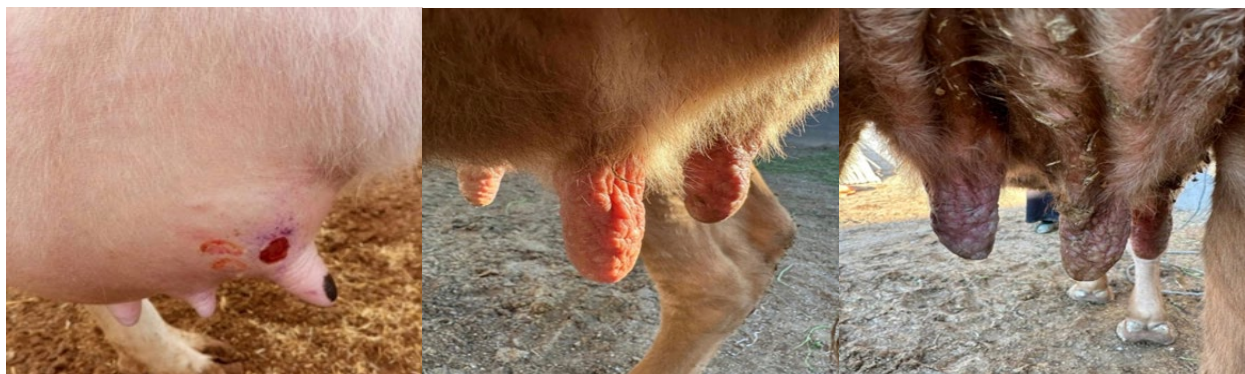


Fig. 1. Clinical bovine mastitis presenting with udder inflammation and swelling

Following the initial field visual evaluation, the California Mastitis Test was implemented for deeper diagnostic profiling. The CMT showed positive reactions with varying degrees of gel formation and precipitate in milk samples from the affected quarters, indicating significantly elevated somatic cell counts associated with both clinical and subclinical mastitis cases.

Isolation and characterization of bacteria

Isolation of *S. aureus*

A total of 65 samples were collected from cows which showed clinical symptoms of mastitis. The period from August to December 2025 saw the collection and testing of these samples. The research findings demonstrated that 58 isolates which represented 89.23 % of the samples

showed pathogen development from cows with clinical mastitis, but 7 samples which accounted for 10.76 % exhibited no pathogen development.

The study obtained growth of *Staphylococcus aureus* in 10 samples which represented 15.38 % of the total samples. The growth patterns of *S. aureus* become evident through various media including Blood agar and Mannitol salt agar, and the process of microscopic analysis which involved Gram staining all 10 isolates. The cells appeared as Gram-positive cocci, mostly arranged in grape-like irregular clusters. The first step of identification involved using biochemical tests to identify all isolates through Catalase and Coagulase and DNase testing. All these tests were positive for *S. aureus*.

Isolation of *Serratia marcescens*

Bacterial isolation was performed on 65 milk samples, yielding four isolates identified as *Serratia marcescens*, constituting 6.15 % of the total specimens examined. Upon cultivation under standard conditions (37 °C for 24 hours), distinct morphological phenotypes were observed across the various culture media employed. Through MacConkey agar testing, the bacteria showed their delayed or weak ability to ferment lactose, producing prominent red colonies primarily due to the unique feature where *S. marcescens* naturally produces its own pigment; these findings match the information which previous studies have already presented [15].

The light microscope revealed that the isolated bacteria showed rod-shaped structures while maintaining their Gram-negative cell wall characteristics. The complete biochemical analysis showed that *Serratia marcescens* exhibits the following characteristics: Gram-negative staining and rod-shaped structure and positive catalase test and negative oxidase test and lactose non-fermentation and positive motility and negative indole production and positive citrate test and yellow slant and yellow butt (A/A) in Triple Sugar Iron (TSI) medium and positive DNase test and negative urease test according to standard criteria [16].

VITEK-2 compact system analysis

For definitive verification, the isolates were subjected to the VITEK 2 automated identification system, which revealed perfect (100 %) congruence at the species level, supported by a probability index of 99 %. The analytical method produced confirmed taxonomic results which scientists could depend on with their highest degree of accuracy and trustworthiness.

Biofilm formation assay

Bacterial biofilms create persistent infections which veterinary professionals find difficult to manage. The research divides bacteria into two groups which include biofilm-producing bacteria and non-biofilm-producing bacteria by using the microtiter method for analysis. The method functions as the primary technique which detects biofilm formation through its frequent application in research.

Biofilm production in *S. aureus*

The ten *Staphylococcus* isolates underwent biofilm formation evaluation which resulted in their classification into three groups based on their biofilm production levels: weak, moderate, and strong. The distribution of biofilm phenotypes was as follows: three isolates (30 %) were classified as weak producers, three isolates (30 %) demonstrated moderate biofilm formation, and four isolates (40 %) exhibited strong biofilm-producing capability, as summarized in **Table 4**.

The experimental variations in biomass density and the distinct gradients of crystal violet staining reflecting weak, moderate, and strong biofilm categories among the tested staphylococcal strains are visually illustrated in **Figure 2**.

Table 4

Distribution and intensity of phenotypic biofilm production among individual *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates

Isolate designation	Weak biofilm	Moderate biofilm	Strong biofilm
<i>S. aureus</i> Staph 1	+	–	–
<i>S. aureus</i> Staph 2	–	–	+
<i>S. aureus</i> Staph 3	–	–	+
<i>S. aureus</i> Staph 4	–	–	+
<i>S. aureus</i> Staph 5	–	+	–
<i>S. aureus</i> Staph 6	–	–	+
<i>S. aureus</i> Staph 7	+	–	–
<i>S. aureus</i> Staph 8	+	–	–
<i>S. aureus</i> Staph 9	–	+	–
<i>S. aureus</i> Staph 10	–	+	–

Note: «+» indicates the presence of a specific biofilm-forming phenotype; «–» indicates the absence of the corresponding biofilm-forming intensity.

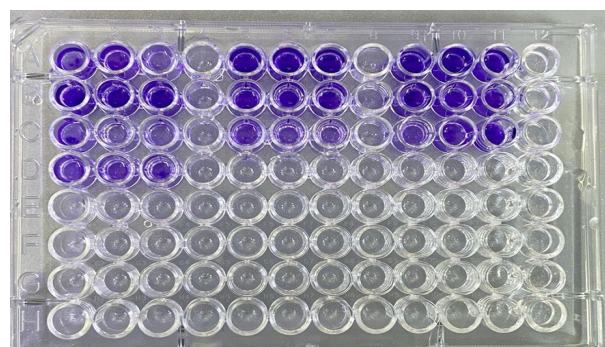


Fig. 2. Microtiter plate quantitative assay for *Staphylococcus aureus* isolates displaying distinct gradients of biofilm biomass production intensity

The observed variations in staining intensity visually reflect the total accumulated mass of the extracellular polymeric matrix. Well-developed, strong biofilm architectures retained a higher concentration of the crystal violet dye, resulting in deeper optical density values during subsequent spectrophotometric quantification.

Biofilm production in *S. marcescens*

Serratia marcescens has recently become a source of rising concern due to its tendency to form biofilms. The research study identified four *S. marcescens* isolates which demonstrated biofilm formation, as summarized in **Table 5**.

Table 5

Distribution and intensity of phenotypic biofilm production among individual *Serratia marcescens* bovine mastitis isolates

Isolate designation	Weak biofilm	Moderate biofilm	Strong biofilm
<i>S. marcescens</i> Se.1	–	+	–
<i>S. marcescens</i> Se.2	–	–	+
<i>S. marcescens</i> Se.3	–	–	+
<i>S. marcescens</i> Se.4	–	–	+

Note: «+» indicates the presence of a specific biofilm-forming phenotype; «–» indicates the absence of the corresponding biofilm-forming intensity.

Biofilms exist as surface-attached microbial communities which produce an extracellular matrix that contains polysaccharides and proteins and nucleic acids and lipids and various other macromolecular substances and chemical compounds. The matrix depends on extracellular polysaccharides which perform multiple essential roles including surface and cellular adhesion and biofilm development and maintenance and cell defense against environmental threats and predators which include antimicrobial substances and immune system components. The experimental manifestations of these macro-structures across different intensities are illustrated in **Figure 3**.

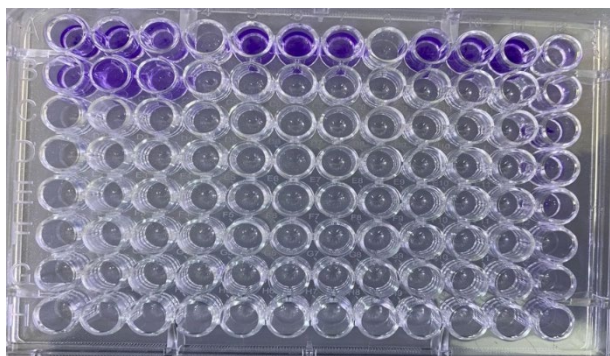


Fig. 3. Microtiter plate quantitative assay for *Serratia marcescens* isolates displaying distinct gradients of biofilm biomass production intensity

The documented phenotypic shifts in staining intensity among the environmental-opportunistic strains visually reflect the accumulated volume of the extracellular polymeric substance (EPS) matrix. The dominant portion of the isolates exhibited a strong biofilm layer, which secures the embedded cells and enhances structural stability during colonization.

Antimicrobial activity of *C. frutescens*

The research investigated the antibacterial effectiveness of *Capsicum frutescens* against two bacterial strains which included *Staphylococcus aureus* and *Serratia marcescens*. The agar well diffusion assay was used to test different amounts of *C. frutescens* through two concentration levels (500 and 1000 µg/ml) which produced different sizes of inhibition zones against the isolated pathogens.

The diameter of the zones of inhibition demonstrated a clear concentration-dependent relationship with respect to *C. frutescens*; progressively higher concentrations of the extract yielded a concomitant and proportional increase in the extent of the inhibitory halos. This extract had an effective impact in inhibiting these types of bacteria, as illustrated in **Figure 4**.

The recorded diameters of the inhibitory halos visually reflect the diffusion kinetics of the bioactive phytochemical components through the agar matrix. The maximum concentration of 1000 µg/ml consistently achieved a more expansive zone of clearance compared to the lower dose, confirming the potent dose-dependent bactericidal action of the extract against both

Gram-positive and Gram-negative mastitis-associated strains.

From the 65 milk samples collected from cows with clinical mastitis, bacterial isolation identified *Staphylococcus aureus* in 10 (15.38 %) samples and *Serratia marcescens* in 4 (6.15 %) samples. The biofilm formation ability of *S. aureus* isolates became evident through phenotypic testing which showed 3 isolates (30 %) produced weak biofilms and 3 isolates (30 %) made moderate biofilms and 4 isolates (40 %) produced strong biofilms. For the *S. marcescens* isolates, 1 strain created a moderate biofilm layout while the other 3 isolates formed robust biofilm structures.

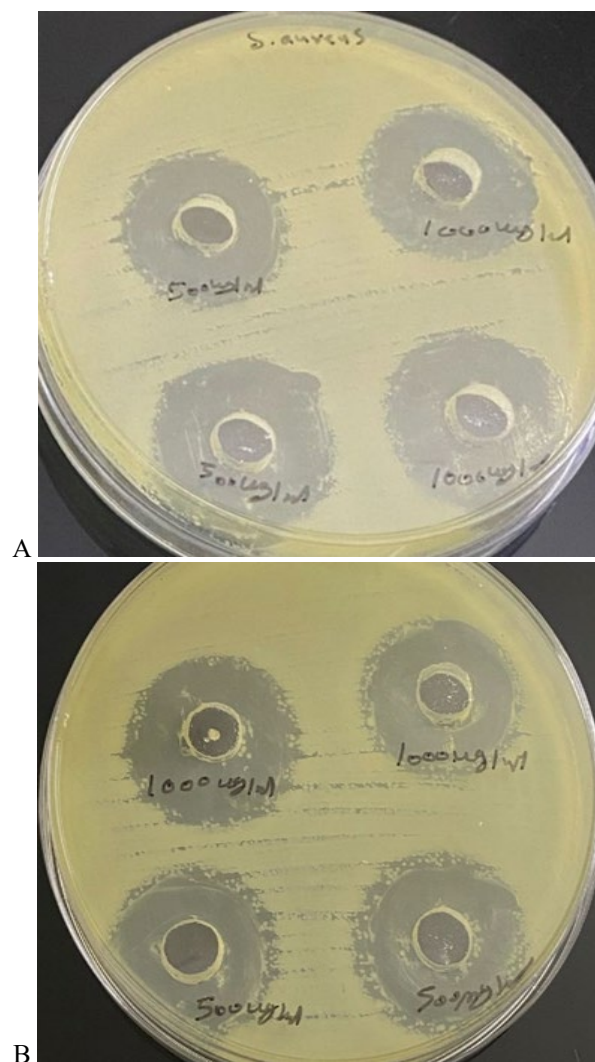


Fig. 4. Antibacterial activity of *Capsicum frutescens* extract against (A) *Staphylococcus aureus* and (B) *Serratia marcescens*

The milk samples from clinical mastitis cases showed various visible changes which included yellowish to watery discoloration and flaky or clotted milk that indicated an inflammatory process. The California Mastitis Test (CMT) showed different levels of milk gel formation and color changes which indicated increased somatic cell counts and modified pH values that occurred during clinical and subclinical mastitis cases [9].

Molecular detection of biofilm-associated genes

The Polymerase Chain Reaction (PCR) method served to screen the local isolates for specific genetic determinants associated with active efflux pump platforms and matrix production. Genotypic analysis utilizing primers targeting the *norA* gene revealed positive amplification products in 2 of the evaluated *Staphylococcus aureus* strains (Fig. 5).

Electrophoretic separation in the first lane on the left contains the DNA marker (Ladder), which serves as a molecular ruler to determine the size of the amplified PCR products. The two distinct bands visualized in lanes 2 and 3 confirm that the target DNA sequence underwent successful amplification, migrating precisely at the expected size of 391 base pairs, which matches the target *norA* gene fragment. Consequently, these findings confirm that the evaluated staphylococcal isolates demonstrate positive genotypic profiles for the *norA* determinant.

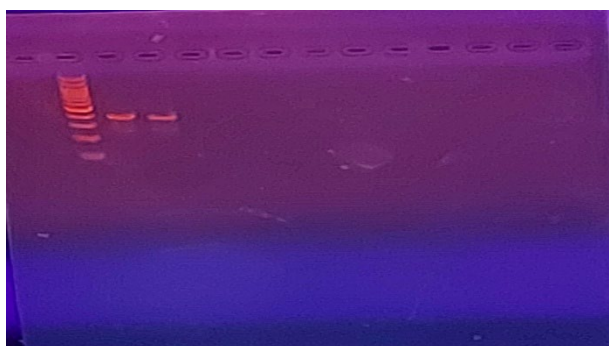


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis (1 %) showing PCR amplification products of the *norA* gene from *Staphylococcus aureus* milk isolates: Lane 1 – DNA ladder; Lanes 2 and 3 – positive *norA* amplicons (391 bp)

Concurrently, the results of Agarose Gel Electrophoresis for the molecular detection of the *bsmA* gene in *Serratia marcescens* were evaluated to verify the genotypic potential for biofilm maturation. The left lane contains the DNA marker (Ladder), serving as a reference scale that enables users to measure the size of PCR products through base pair measurement.

The successful targeted amplification of the *bsmA* virulence factor becomes evident through the clear, consistent bands appearing in lanes 2 and 3 (Fig. 6). The migration of these targeted fragments at 298 bp confirms that the evaluated environmental-opportunistic *S. marcescens* isolates harbor this essential biofilm-mediating determinant.

In conclusion, the successful genotypic screening of the selected isolates highlights the solid molecular foundation underpinning their virulence profiles. The identification of the multidrug efflux pump gene *norA* in *Staphylococcus aureus* strains, coupled with the ubiquitous detection of the *bsmA* biofilm-mediating determinant in *Serratia marcescens* strains, confirms that these mastitis-associated pathogens possess the necessary genetic machinery to sustain long-term persistence within

the mammary gland tissue. These molecular findings provide crucial baseline data that directly support the phenotypic resistance and robust biofilm traits observed during the initial laboratory assays.

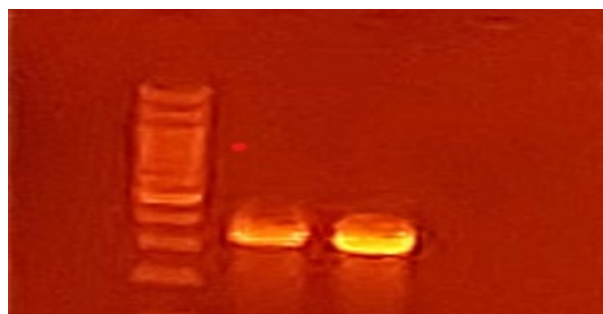


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis (1 %) for the molecular identification of the *bsmA* gene in *Serratia marcescens* isolates: Lane 1 – DNA ladder; Lanes 2 and 3 – positive *bsmA* amplicons (298 bp)

Laboratory personnel collected and identified pathogenic bacteria which included *Staphylococcus aureus* to prove that microbial agents trigger mastitis infections in this particular region. The study revealed that *S. aureus* represented the most common pathogen among coagulase-positive *Staphylococcus* species with a frequency of 15.38 % within the evaluated cohort. These surveillance findings match the results from [17], but are lower than the findings from [18], who discovered a 30.0 % isolation rate during their historical screenings. The primary reason for the persistent isolation of *S. aureus* is its wide ecological distribution inside the bovine mammary gland and on the surrounding udder skin. Furthermore, the widespread practice of manual hand milking, combined with incorrect or unverified drug administration to combat mastitis infections, seems to support the horizontal spread of these contagious pathogens through direct milker hand contact during routine milk handling operations [19].

The bacterial analysis of the 65 milk samples also detected *Serratia marcescens* in 4 samples, which equals 6.15 % of the total milk samples examined. In comparison, previous epidemiological screening [20] found that 4 (3.33 %) of 120 monitored dairy cows developed *Serratia marcescens* mastitis, which contrasts with the slightly higher prevalence rate noted in the current research findings. The milk samples which underwent culturing developed various bacterial growth patterns on distinct media types after laboratory personnel incubated them under aerobic conditions at 37°C for 24 hours. On MacConkey agar, the growing colonies exhibited a delayed or weak ability to ferment lactose, appearing as characteristic red colonies primarily due to the inherent biochemical capability of *S. marcescens* to synthesize its own endogenous pigment. These morphological and pigment-producing results are in complete agreement with the diagnostic baselines established by [3]. The bacteria which were isolated showed up as classic Gram-negative rods when viewed through a standard light microscope.

The VITEK 2 Compact automated system successfully confirmed the definitive diagnosis of the recovered milk isolates through its improved biochemical testing cards, which leads to significantly enhanced and reliable diagnostic results. The automated VITEK 2 system produces better results than traditional manual tube methods by generating rapid diagnostic solutions which deliver precise species identification results. This automated platform employs a standardized method which enables fast pathogen identification while maintaining accurate diagnostic results [21].

Previous studies have shown that *Staphylococcus aureus* strains exhibit different levels of biofilm formation ability depending on their origin and environmental triggers. For instance, a prior study evaluated 31 clinical *S. aureus* strains, showing that nine strains developed strong biofilms while twelve strains produced moderate biofilms and ten strains had minimal biofilm formation [22]. Concurrently, separate research conducted on 100 clinical isolates showed a different distribution pattern, which found that twenty strains did not produce biofilms while thirty-two strains formed moderate biofilms and forty-eight strains developed strong, highly adherent biofilms [23].

The current study discovered that 100 % of the *S. aureus* isolates which researchers tested developed biofilms during the microtiter assays. These research findings closely match the structural results from [24], who found that all 58 *S. aureus* strains obtained from various clinical samples tested positive for biofilm formation, with eight strains showing weak production, twenty-eight strains showing moderate production, and twenty-two strains showing strong matrix production.

Biofilm formation serves as the main virulence factor which allows *S. aureus* to survive within the host environment, because the multi-layered extracellular matrix effectively shields the embedded bacteria from both antimicrobial medication attacks and host immune system responses [25]. These sessile biofilm communities serve as essential factors which drive the development and worsening of multiple severe chronic diseases in dairy cattle. The research suggests that *Staphylococcus aureus* strains develop different biofilm-forming capacities because their genetic expression patterns and regulatory networks show significant variations [26]. Equally significant is the profound influence of ambient environmental parameters on the initiation, cellular attachment, and subsequent maturation of these complex biofilm architectures [27].

Research demonstrates that *Serratia marcescens* bacteria produce robust biofilms. This study follows the research guidelines which previous investigators [28, 29] used to identify the phenotypic biofilm profiles of *S. marcescens* strains obtained from clinical samples. Research has proven that *S. marcescens* clinical isolates create biofilms which protect them from standard medical antibiotics. Biofilm formation by clinical bacterial pathogens leads to device-associated chronic infections, which represent the main cause of these persistent conditions [28].

Bacterial biofilms create an antimicrobial resistance system which significantly exceeds the protective level

found in free-floating planktonic cells. *S. marcescens* has developed an adaptive method which shows how bacteria buried in extracellular polymeric matrices can build resistance to environmental forces that help them survive in nature and fight for ecological resources. Biofilm production creates two major problems which affect both animal health and industrial bio-processing facilities. Laboratory personnel have not fully discovered the exact molecular process which *S. marcescens* uses to stick to living and non-living surfaces, even though they know about its broad ability to attach to many different surfaces [30].

Preparations derived from *Capsicum frutescens* exhibited substantial antimicrobial efficacy against the complete spectrum of bacterial strains subjected to testing, thereby confirming the potent bactericidal potential of this plant material. The observed therapeutic activity is attributable to pharmacologically active constituents present within the extract matrix. The bioactive substances seem to be secondary metabolites, which include capsaicin and dihydrocapsaicin according to the study by [31], who conducted a complete phytochemical investigation of *Capsicum* species and found these substances to be the main factors which produced the antibacterial effects in the extracted samples.

The research outcomes from this study match the results which previous literature [32] published about *Capsicum frutescens* extracts that showed strong antibacterial effects against all bacterial strains tested. The current research findings duplicate the results from [33], who discovered that *Capsicum* species develop strong antibacterial properties which stop the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* species, and *Bacillus subtilis*.

The study authors confirmed that *Capsicum* plants produce their own natural antimicrobial properties through their research findings. The unprocessed crude *C. frutescens* extract component showed better antibacterial properties than the highly processed version during the evaluation of crude extracts. The intensive downstream filtration process seems to remove the essential active components which exist in the extract. The research findings from [34] showed similar results in their evaluation of botanical spices and condiments.

The research found *Staphylococcus aureus* and *Serratia marcescens* at rates of 15.38 % and 6.15 % respectively in mastitic milk samples from Diyala governorate, which confirms their established position as major mastitis pathogens according to previous studies [8, 9]. The study reveals an important discovery about the extensive presence of biofilm-producing bacteria which create robust biofilms in *S. aureus* and *S. marcescens* bacteria. Biofilms create a defensive shield which prevents immune system attacks and blocks antibiotic access, thus leading to ongoing infections that become resistant to treatment, which explains why mastitis continues to affect animals [35, 36].

Clinical mastitis causes milk to change from its normal white appearance into yellowish or watery form while it develops flakes and clots because of the inflammatory process, which enables blood elements and

white blood cells to penetrate milk through increased blood vessel leakage [9]. The California Mastitis Test (CMT) detects milk changes through somatic cell count elevation and pH modification to identify inflammation at its earliest stage, which includes cases without any visible milk alterations. The CMT reagent contains a pH indicator which changes to a stronger purple shade when milk pH levels rise because of inflammation. The progression of severe cases results in permanent damage to the udder, which includes fibrosis, because the tissue transforms into connective tissue that creates a hardened udder which no longer produces milk [7, 9].

The chromosomal structure of *Staphylococcus aureus* contains various genetic elements which produce virulence factors, antimicrobial resistance systems, and multi-drug efflux systems that create its ability to cause disease and adapt to new environments. The organism develops antimicrobial agent resistance through various independent mechanisms which operate differently from each other. The efflux pump system functions as an essential mechanism which removes antimicrobial substances from inside cells to reduce their internal levels and decrease their effectiveness as treatments.

Research has shown that *S. aureus* clinical isolates which contain these efflux systems will develop ciprofloxacin resistance [37]. The transporters operate with an extensive range of substrate recognition which extends to antibiotics, antiseptic agents, chromogenic dyes, and detergent compounds. The genes which control efflux pumps exist on bacterial chromosomes to maintain their presence in bacteria and to enable their transfer to following bacterial populations. These systems function as a fundamental defensive strategy, enabling *S. aureus* to withstand antimicrobial pressure through active compound expulsion [38].

Based on phylogenetic and amino acid sequence homology, bacterial efflux transporters are taxonomically classified into five principal superfamilies: (1) the Major Facilitator Superfamily (MFS), (2) the ATP-Binding Cassette (ABC) family, (3) the Resistance-Nodulation-Division (RND) family, (4) the Small Multidrug Resistance (SMR) family, and (5) the Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) family [39]. Notably, the *norA* gene product represents a constituent of the MFS efflux pump superfamily. Moreover, *norA* was present in ciprofloxacin-resistant MRSA strains as reported by studies conducted by [40–42].

Serratia marcescens depends on the quorum-sensing system to create biofilms by going through a series of unique steps that produce a highly porous, filamentous biofilm composed of clusters, filaments, and chains of cells. An increase in population density activates a gene regulatory system called quorum sensing. *S. marcescens* coordinates quorum sensing via acyl homoserine lactone (AHL), which controls the formation of biofilms, swarming motility, and prodigiosin production [43].

It is common knowledge that quorum sensing (QS) contributes to bacterial pathogenicity, antibiotic resistance, and biofilm formation. Thus, QS inhibition may lower the chance of microbial pathogenicity in both local and systemic infections [43]. Previous genotypic characterization has confirmed that the evaluated isolates

harbored the *bsmA* gene [44], establishing this determinant as a key genetic marker for biofilm validation in environmental-opportunistic lineages.

Conclusions

This study confirms the significant prevalence of biofilm-producing *Staphylococcus aureus* (15.38 %) and *Serratia marcescens* (6.15 %) in 65 examined bovine clinical and subclinical mastitis milk samples within Diyala governorate, establishing that 100% of these isolated pathogens possess phenotypic biofilm-forming capacities (ranging from weak to strong adherence) with verified molecular expression of the multidrug efflux pump gene *norA* (391 bp) and the matrix-mediating determinant *bsmA* (298 bp) which directly underpins the chronicity, therapeutic recalcitrance, and mitigation difficulties of chronic intramammary infections. The California Mastitis Test (CMT) proved to be an invaluable and highly sensitive field diagnostic tool for the early-stage detection of both clinical and subclinical configurations before irreversible parenchymal tissue remodeling occurs, using pathognomonic milk color variations and specific gel formation profiles as critical inflammation indicators. Furthermore, crude ethanolic extract of *Capsicum frutescens* at targeted concentrations of 500 and 1000 µg/mL demonstrated profound, concentration-dependent antibacterial and anti-biofilm potential by generating prominent zones of inhibition against both persistent strains, proving that understanding these genotypic matrix mechanisms alongside the practical field utility of the CMT is paramount for engineering effective targeted phytotherapeutic prevention protocols to mitigate the severe economic impact of bovine mastitis in dairy herds.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The authors confirm that the studies were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), national bioethical norms, and international standards for the humane treatment of animals. The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of the College of Veterinary Medicine, University of Diyala, Iraq (Approval No. SR 1233 - 1/6/2025). The *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus* samples investigated in this research were recovered from clinical veterinary cases during routine diagnostic and sanitary screening.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The authors state that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors express their sincere gratitude to everyone who contributed to this research and supported the completion of this study.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The authors declare that no generative AI or AI-assisted technologies were used during the preparation, writing, translation, or language polishing of this manuscript. The final content was fully authored and reviewed by the researchers, who take joint responsibility for the work.

References

- Kasa, G., Tegegne, B., & Tadesse, B. (2020). Isolation and identification of major pathogenic bacteria from clinical mastitic cows in Asella town, Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2020, 6656755. <https://doi.org/10.1155/2020/6656755>
- Tarazona-Manrique, L. E., Villate-Hernández, J. R., & Andrade-Becerra, R. J. (2019). Bacterial and fungal infectious etiology causing mastitis in dairy cows in the highlands of Boyacá (Colombia). *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia*, 66(3), 208–218. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v66n3.84258>
- Abdullah, A. H., Nadhom, B. N., & Al-Ammiri, H. H. (2017). Isolation and identification of *Serratia marcescens* from bovine mastitis infections in Iraq and their susceptibility to antibiotics. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(2), 489–492.
- Achek, R., Hotzel, H., Nabi, I., Kechida, S., Mami, D., Didouh, N., Tomaso, H., Neubauer, H., Ehrlich, R., Monecke, S., & El-Adawy, H. (2020). Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from different sources in Algeria. *Pathogens*, 9(2), 153. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020153>
- Chen, S., Blom, J., & Walker, E. D. (2017). Genomic, physiologic, and symbiotic characterization of *Serratia marcescens* strains isolated from the mosquito *Anopheles stephensi*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01483>
- Bi, Y., Wang, Y. J., Qin, Y., Guix Vallverdú, R., Maldonado García, J., Sun, W., Li, S., & Cao, Z. (2016). Prevalence of bovine mastitis pathogens in bulk tank milk in China. *PLOS ONE*, 11(5), e0155621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155621>
- Friman, M. J., Eklund, M. H., Pitkälä, A. H., Rajala-Schultz, P. J., & Rantala, M. H. J. (2019). Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 61, 54. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0488-7>
- Stanek, P., Żółkiewski, P., & Januś, E. (2024). A review on mastitis in dairy cows research: Current status and future perspectives. *Agriculture*, 14(8), 1292. <https://doi.org/10.3390/agriculture14081292>
- Iraguha, B., Hamudikuwanda, H., Mushonga, B., Kandiwa, E., & Mpatwenumugabo, J. P. (2017). Comparison of cow-side diagnostic tests for subclinical mastitis of dairy cows in Musanze district, Rwanda. *Journal of the South African Veterinary Association*, 88, a1464. <https://doi.org/10.4102/jsava.v88i0.1464>
- Quinn, P. J., Markey, B. K., & Carter, M. E. (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*. Blackwell Science.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., & Tenover, R. C. (Eds.). (2003). *Manual of clinical microbiology* (8th ed.). ASM Press.
- Zhang, D., Xia, J., Xu, Y., Gong, M., Zhou, Y., Xie, L., & Fang, X. (2014). Biological features of biofilm-forming ability of *Acinetobacter baumannii* strains derived from 121 elderly patients with hospital-acquired pneumonia. *Clinical and Experimental Medicine*, 16(1), 73–80. <https://doi.org/10.1007/s10238-014-0333-2>
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D., Fatma, T., & Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24(1), 25. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.19890>
- Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. (2007). Final Report on the Safety Assessment of *Capsicum annuum* Extract, *Capsicum annuum* Fruit Extract, *Capsicum annuum* Resin, *Capsicum annuum* Fruit Powder, *Capsicum frutescens* Fruit, *Capsicum frutescens* Fruit Extract, *Capsicum frutescens* Resin, and Capsaicin. *International Journal of Toxicology*, 26(1 suppl), 3–106. <https://doi.org/10.1080/10915810601163939>
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2007). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology* (24th ed.). McGraw-Hill Medical.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S., & Fitzpatrick, E. S. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Bekele, T., Lakew, M., Terefe, G., Koran, T., Olani, A., Yimesgen, L., Tamiru, M., & Demissie, T. (2019). Study on bovine mastitis with isolation of bacterial and fungal causal agents and assessing antimicrobial resistance patterns of isolated *Staphylococcus* species in and around Sebeta town, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 13(1), 23–32. <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8909>
- Mulugeta, Y., & Wassie, M. (2013). Prevalence, risk factors and major bacterial causes of bovine mastitis in and around Wolaita Sodo, Southern Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 7(48), 5400–5405. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6261>
- Jones, G. M., & Bailey, T. L., Jr. (1998). *Understanding the basics of mastitis* (Publication No. 404-233). Virginia Cooperative Extension.
- Di Guardo, G., Battisti, A., Agrimi, U., Forletta, R., Reitano, M. E., & Calderini, P. (1997). Pathology of *Serratia marcescens* mastitis in cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 44(1–10), 537–546. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1997.tb01005.x>
- Hassoon, S. J., Ali, H. I., Mohammed, A. J., & Salman, O. (2024). Antimicrobial action of silver nanoparticles manufactured from cinnamon bark extract against bacteria isolated from fresh sheep meat in Baquba city. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 12(12), 2335–2344. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2024/12.12.2335.2344>
- AlKhafaji, Z. A., Darweesh, M. F., & Al-Musawi, A. F. (2024). Preparation of vaccine from biofilm proteins of *Staphylococcus aureus* and incorporate it in liposomes for induction of CXCL-5 production in albino rats. *Iraqi Journal of Science*, 65(8), 4189–4199. <https://doi.org/10.24996/ijis.2024.65.8.5>
- Ali, A. M., & Abdallah, M. M. (2022). Study of phenotypic and genotypic factors of *Staphylococcus aureus* clinical local isolates. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 33(4), 49–56. <https://doi.org/10.23851/mjs.v33i4.1166>
- Alkhafaji, R. T. A., & Al-Mathkhury, H. J. F. (2023). Gentamicin upregulates the gene expression of hla and nuc in *Staphylococcus aureus*. *Iraqi Journal of Science*, 64(3), 1079–1092. <https://doi.org/10.24996/ijis.2023.64.3.5>
- Abdel-Shafi, S., El-Serwy, H., El-Zawahry, Y., Zaki, M., Sitohy, B., & Sitohy, M. (2022). The association between *icaA* and *icaB* genes, antibiotic resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus* spp. *Antibiotics*, 11(3), 389. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030389>
- Omid, M., Firoozeh, F., Saffari, M., Sedaghat, H., Zibaei, M., & Khaledi, A. (2020). Ability of biofilm production and molecular analysis of *spa* and *ica* genes among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Research Notes*, 13, 19. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4885-9>
- Taj, Y., Essa, F., Aziz, F., & Kazmi, S. U. (2011). Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6(05), 403–409. <https://doi.org/10.3855/jidc.1743>
- Ray, C., Shenoy, A. T., Orihuela, C. J., & González-Juarbe, N. (2017). Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16, 19. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0192-2>
- Ramanathan, S., Ravindran, D., Arunachalam, K., & Arumugam, V. R. (2017). Inhibition of quorum sensing-dependent biofilm and virulence genes expression in environmental pathogen *Serratia marcescens* by petroselinic acid. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(4), 501–515. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0971-y>
- Koo, H., & Yamada, K. M. (2016). Dynamic cell-matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments. *Current Opinion in Cell Biology*, 42, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.cceb.2016.05.005>
- Gayathri, N., Gopalakrishnan, M., & Sekar, T. (2016). Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Capsicum chinense* Jacq. *International Journal of Advances in Pharmaceutics*, 5(1), 12–20.

32. Bello, I., Boboye, B. E., & Akinyosoye, F. A. (2015). Phytochemical screening and antibacterial properties of selected Nigerian long pepper (*Capsicum frutescens*) fruits. *African Journal of Microbiology Research*, 9(38), 2067–2078. <https://doi.org/10.5897/ajmr2014.7286>
33. Koffi-Nevry, R., Kouassi, K. C., Nanga, Z. Y., Koussémon, M., & Loukou, G. Y. (2012). Antibacterial activity of two bell pepper extracts: *Capsicum annum* L. and *Capsicum frutescens*. *International Journal of Food Properties*, 15(5), 961–971. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.509896>
34. Boboye, B., Babatunde, T., & Onoriode, A. (2007). Antibacterial activities of some plants used as condiments and spices in Nigeria. *Current World Environment*, 2(2), 171–174. <https://doi.org/10.12944/cwe.2.2.11>
35. Notcovich, S., DeNicolo, G., Flint, S., Williamson, N., Gedy, K., Grinberg, A., & Lopez-Villalobos, N. (2018). Biofilm-forming potential of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in New Zealand. *Veterinary Sciences*, 5(1), 8. <https://doi.org/10.3390/vetsci5010008>
36. Liang, Z., Shen, J., Liu, J., Sun, X., Yang, Y., Lv, Y., Zheng, J., Mou, X., Li, H., Ding, X., & Yang, F. (2023). Prevalence and characterization of *Serratia marcescens* isolated from clinical bovine mastitis cases in Ningxia Hui Autonomous Region of China. *Infection and Drug Resistance*, 16, 2727–2735. <https://doi.org/10.2147/IDR.S408632>
37. Hassanzadeh, S., Mashhadi, R., Yousefi, M., Askari, E., Saniei, M., & Pourmand, M. R. (2017). Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 111, 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.026>
38. Kosmidis, C., Schindler, B. D., Jacinto, P. L., Patel, D., Bains, K., Seo, S. M., & Kaatz, G. W. (2012). Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(3), 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.014>
39. Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), 223–229. <https://doi.org/10.4161/viru.23724>
40. Pourmand, M. R., Yousefi, M., Salami, S. A., & Amini, M. (2014). Evaluation of expression of norA efflux pump in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* against hexahydroquinoline derivative by real-time PCR. *Acta Medica Iranica*, 52(6), 424–429.
41. Haddadi Zahmatkesh, M. A., Laripoor, M., Mirzaie, A., & Ashrafi, F. (2016). Prevalence of norA and norB efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and their contribution in ciprofloxacin resistance. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 10(5), 20–30.
42. Mirzaie, A., Noorbazargan, H., Rahmati, H., & Zandi, M. (2016). A study of gene expression and activity of norA efflux pump in clinical isolates of ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 18(10), 63–70.
43. Musthafa, K. S., Shunmugiah, K. P., & Arumugam, V. R. (2012). Inhibition of quorum-sensing-dependent phenotypic expression in *Serratia marcescens* by marine sediment *Bacillus* spp. SS4. *Annals of Microbiology*, 62(1), 443–447. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0262-1>
44. Alattar, N. S., Tawfeeq, H. K., & Hasan, J. M. (2025). Effect of prodigiosin in biofilm formation of its producing bacterial isolates. *Iraqi Journal of Science*, 66(10), 4179–4189. <https://doi.org/10.24996/ij.s.2025.66.10.13>

ORCID

- S. R. Abdulhussain  <https://orcid.org/0000-0001-8462-140X>
 R. A. Hussein  <https://orcid.org/0009-0009-9922-2546>
 M. A. Hasan  <https://orcid.org/0009-0000-9548-8376>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Protective effect of Shilajit against Bisphenol A-induced pulmonary histopathological alterations in male mice

M. A. Hussein 

Article info

Correspondence Author

M. A. Hussein

E-mail:

muayad.a@uokerbala.edu.iq

College of Veterinary
Medicine, University of
Kerbala,
Karbala, 56001, Iraq

Citation: Hussein, M. A. (2026). Protective effect of Shilajit against Bisphenol A-induced pulmonary histopathological alterations in male mice. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 161–167. doi: 10.31210/spi2026.29.02.23

Bisphenol A (BPA) is a pervasive industrial environmental pollutant widely used in chemical manufacturing, leading to continuous human and animal exposure through food and resource contamination. While its broad multi-organ toxicities are well-documented, its sub-acute destructive impact on mammalian respiratory histology requires comprehensive elucidation. Conversely, Shilajit is a traditional mineral pitch known for its potent organic constituents. This study evaluated the lung tissue alterations induced by sub-acute oral BPA exposure and investigated the potential protective efficacy of concurrent Shilajit administration in a male mouse model. Thirty healthy adult male mice were randomly assigned to three equal cohorts: vehicle control (G1), toxic exposure group receiving BPA at 400 mg/kg body weight (G2), and co-treatment group receiving BPA concurrently with Shilajit at 0.5 g/kg body weight (G3) via oral gavage for 21 consecutive days. Following euthanasia, longitudinal lung tissue samples were promptly fixed in 10 % neutral buffered formalin for 48 hours, embedded in paraffin blocks, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Stained specimens were subjected to qualitative screening and quantitative scoring. Data were statistically evaluated using Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc, and Fisher's exact tests. Microscopic evaluation revealed extensive, severe structural damage in 90 % of the BPA-alone group (G2), characterized by diffuse interalveolar septal thickening driven by heavy mononuclear cell (MNC) infiltration, dense accumulation of amorphous proteinaceous exudates within the respiratory spaces, perivascular leukocytic aggregation, and focal alveolar wall rupture driving emphysematous alterations. Conversely, concurrent Shilajit administration (G3) significantly mitigated these changes ($P < 0.05$), successfully restoring normal lung histoarchitecture in 70 % of the cohort. The protected parenchyma demonstrated well-preserved alveolar matrices with mild congestion and localized, contained MNC infiltration. Notably, the G3 group uniquely exhibited distinct interstitial granulomatous accumulations and spherical micro-cavities within the microvascular beds, indicating active tissue regeneration.

Keywords: Bisphenol A, Shilajit, pulmonary toxicity, histopathological changes, mice.

Протективний ефект муміє проти індукованих бісфенолом А патоморфологічних змін у легенях самців мишей

M. A. Хусейн

Коледж ветеринарної
медицини, Університет
Кербели,
Кербела, Ірак

Бісфенол А є поширеною промисловою хімічною речовиною, яка широко використовується у виробництві епоксидних смол і полікарбонатних пластиків, що призводить до постійного впливу на організм людини та тварин через забруднення харчових продуктів і навколишнього середовища. Хоча системна токсичність бісфенолу щодо різних органів добре вивчена, вибіркового підгострого деструктивного впливу на респіраторну систему потребує подальшого вивчення. Відомо, що муміє є традиційним мінеральним фітокомплексом, відомим в аюрведичній медицині завдяки своїм потужним антиоксидантним, протизапальним і протективним властивостям. Метою цього дослідження було оцінити гістопатологічні зміни в легенях, спричинені підгострим пероральним впливом бісфенолу А, та дослідити потенційну терапевтичну й органопротективну ефективність супутнього введення муміє на моделі самців мишей. Тридцять здорових дорослих самців мишей було випадково розподілено на три рівні групи: контрольна група (G1), група, яка отримувала бісфенол А у дозі 400 мг/кг маси тіла (G2), та група сумісного введення бісфенолу А та муміє у дозі 0,5 г/кг маси тіла (G3) шляхом перорального зондування протягом 21 дня. Після евтаназії поздовжні зрізи легень фіксували в 10 % нейтральному забуференому формаліні, фарбували гематоксиліном та еозином і піддавали якісному скринінгу та кількісному гістопатологічному оцінюванню. Мікроскопічна оцінка виявила значні, тяжкі структурні пошкодження у 90 % тварин групи ВРА (G2), що характеризувалися дифузним потовщенням міжальвеолярних перегородок внаслідок масивної інфільтрації мононуклеарними клітинами, щільним накопиченням аморфного білкового ексудату в просвітах альвеолярних пухирців, периваскулярною лейкоцитарною агрегацією та вогнищевим розривом альвеолярних стінок із розвитком емфізематозних змін. Навпаки, супутнє введення муміє (G3) суттєво нівелювало ці деструктивні зміни ($P < 0,05$), успішно відновлюючи нормальну гістоструктуру легень у 70 % тварин у групі. У тварин, що отримали муміє, паренхіма демонструвала збережену впорядковану будову тонкостінної альвеолярної архітектури, виявляючи лише помірне застійне повнокров'я судин та локалізовану, чітко обмежену периваскулярну інфільтрацію мононуклеарними клітинами. Зокрема, у групі G3 виявлено чітко окреслені інтерстиціальні гранулематозні скупчення у поєднанні з ізольованими сферичними мікрокавернами всередині мікроциркуляторного русла, які структурно нагадували початкову стадію жирової мікроемболії, що свідчить про запуск активного, організованого процесу структурної перебудови тканин.

Ключові слова: бісфенол А, муміє, легенева токсичність, гістопатологічні зміни, миші.

Бібліографічний опис для цитування: Хусейн М. А. Протективний ефект муміє проти індукованих бісфенолом А патоморфологічних змін у легенях самців мишей. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 161–167.



Introduction

Bisphenol A (BPA) is a well-known industrial chemical widely used in the manufacturing of epoxy resins and polycarbonate plastics, which is commonly associated with everyday human exposure via food contamination [1, 2]. Regarding its health hazards, BPA induces chronic inflammation, oxidative stress, DNA damage, and fibrotic reactions in multiple organs [3–5]. Several studies [6, 7] have demonstrated the toxic effects of BPA on the respiratory system, highlighting inflammation, oxidative stress, and apoptosis as the primary pathways involved in BPA-induced lung injury.

The phenomenon of bisphenol leaching from polycarbonate flasks was first discovered in 1993, notably during autoclaving procedures that subsequently triggered the proliferation of breast cancer cells in laboratory settings [8]. Both laboratory animals and humans readily absorb BPA. When ingested orally, its bioavailability and metabolic pathways present complex dynamics: while a portion remains unaltered, more than 90 % of the circulating chemical binds to plasma proteins [9]. As it passes through the liver, the absorbed bisphenol undergoes extensive hepatic metabolism before systemic distribution [10].

Shilajit (commonly known as Mumie, or Hajar ulmus in Arabic) is a natural mineral pitch that slowly emerges from sedimentary rock layers in high-altitude mountain ranges during warm seasons. It is produced via the protracted humification of specific plant matter over centuries. Phytochemical analyses indicate that 60–70 % of Shilajit consists of a rich organic humus, heavily packed with its principal bioactive constituents: fulvic acid, humic acid, core minerals, and vital trace elements such as selenium, zinc, and iron [11].

While widely celebrated in Ayurvedic traditional medicine for its multi-targeted therapeutic efficacy, the World Health Organization (WHO) has strongly encouraged establishing a rigorous, evidence-based understanding of the safety, quality, and specific organ-protective mechanisms of traditional medicines within modern scientific frameworks [12]. Shilajit's capacity to neutralize dangerous free radicals, block pro-inflammatory cytokine pathways, and promote tissue regeneration marks it as a promising candidate for mitigating chemical-induced toxicity [13].

The aim of the study

Therefore, the purpose of this study was to assess the protective effect of co-administered Shilajit and to investigate the systemic histopathological consequences of sub-acute oral BPA exposure on mouse lung tissue.

Materials and methods

The study was conducted at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kerbala, beginning from 3 January to 24 January, 2026. Specialized cages were utilized for the mice during the experiment.

Animal housing and experimental design

Thirty healthy adult male mice were kept in specialized, well-ventilated polypropylene cages with a 12-hour light/dark cycle and a temperature between 24 and 26 °C. Before beginning treatment, the animals were given unlimited access to clean commercial food pellets and filtered tap water for a week to acclimatize to their surroundings.

Following acclimation, the mice were randomly divided into three equal experimental groups (n = 10):

- Control Group (G1): Received standard water and pellets as a vehicle control.
- BPA Group (G2): Received 400 mg/kg of Bisphenol A.
- BPA + Shilajit Group (G3): Received 400 mg/kg of Bisphenol A plus 0.5 g/kg of Shilajit.

Reagent preparation and oral dosing protocols

Bisphenol A Solution: 3 grams of pure BPA monomer were dissolved in a safe chemical vehicle made up of 25 milliliters of dimethyl sulfoxide (DMSO) and 75 milliliters of distilled water, resulting in a 25 % v/v DMSO base. A computerized magnetic stirrer was used to continuously mix the fluid at room temperature until full chemical dissolution was achieved. Final individual treatment volumes were carefully modified daily in accordance with each mouse's body weight in order to maintain a precise dosage of 400 mg/kg.

Shilajit Solution: 6 grams of pure organic Shilajit were dissolved in 30 ml of distilled water. The mixture was continuously stirred with a magnetic stirrer until a completely homogeneous aqueous solution was produced. Dosing volumes were calculated daily to ensure that each mouse received an accurate oral dose of 0.5 g/kg body weight.

All treatments were carefully delivered using specialized, smooth-tipped stainless steel oral gavage needles to ensure exact systemic absorption and minimize mechanical stress. To avoid possible compound deterioration, pure Bisphenol A and premium Shilajit were made fresh every 48 hours.

Histopathological preparation

After the 21-day course of treatment, each animal was humanely euthanized under mild anesthesia. After the thoracic cavity was surgically opened, the lung organs were carefully removed and macroscopically examined. Representative longitudinal sections of the lung tissues were obtained and promptly immersed in a 10 % neutral buffered formalin fixation solution for 48 hours in order to preserve cellular architecture. Tissue processing and slide staining were performed according to established protocols [14]. The stained lung sections were examined qualitatively under a high-resolution light microscope to evaluate structural and inflammatory changes.

Statistical analysis

Quantitative histopathological scoring and qualitative distribution data were subjected to rigorous statistical evaluation. To assess overall significance and compare differences among the three independent experimental groups, the non-parametric Kruskal-Wallis test was utilized. Following the verification of global significance,

pairwise comparisons between specific cohorts were performed using Dunn's post hoc test.

To determine the strength of the association and the dependency between the type of chemical/therapeutic exposure and the distribution of histopathological severity scores, Fisher's exact test was applied. All statistical analyses were executed using standardized computing software, and differences were considered statistically significant at a threshold of $P < 0.05$.

Results and discussion

Qualitative histopathological evaluation of lung tissue

Microscopic examination of the H&E-stained lung sections across the three experimental groups revealed distinct structural variations. These findings clearly illustrate both the severe negative consequences of sub-acute Bisphenol A (BPA) exposure and the marked protective impact of concurrent Shilajit administration.

In the control group (G1), the lung tissues displayed a well-preserved, normal histological architecture. Tissue sections showed typical polygonal alveoli with thin, delicate walls distributed in regular arrays around normal terminal bronchioles. There were no signs of edema, intravascular congestion, endothelial sloughing, or inflammatory cellular infiltration. Intact pulmonary arteries maintained their normal wall thickness and structural integrity.

In contrast, the lung tissues of the BPA-exposure group (G2) exhibited extensive and severe structural damage. Microscopic analysis under a lower magnification overview revealed a significant, diffuse thickening of the interalveolar connective tissue, paired with marked architectural stress in both the respiratory parenchyma and adjacent conducting elements (**Fig. 1**).

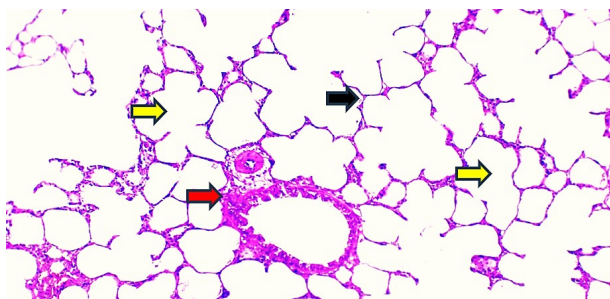


Fig. 1. Histological section of the lung from the Bisphenol A exposure group (G2) at 21 days post-exposure, revealing increased thickness of the interalveolar connective tissue due to fibrosis and mononuclear cell (MNC) infiltration (red arrow), the accumulation of proteinaceous material within the alveolar spaces (yellow arrows), and localized alveolar wall degradation (black arrow) (H&E stain, $\times 100$)

This low-magnification overview highlights the widespread and aggressive nature of BPA-induced pulmonary toxicity. The focal area of intense purple

staining (indicated by the red arrow) marks a major zone of active chronic inflammation, where the delicate septal spaces are completely obliterated by dense sheets of mononuclear immune cells and expanding fibrotic tissue.

Concurrently, the functional gas-exchange spaces are severely compromised; the lumens of several neighboring alveoli (indicated by the yellow arrows) show an accumulation of a light-pink, amorphous proteinaceous substance, which serves as a direct indicator of increased vascular permeability and inflammatory fluid leakage. Furthermore, the structural framework of the distal lung parenchyma is highly unstable, as evidenced by micro-structural stress and early localized degradation of the fragile alveolar walls (indicated by the black arrow). These combined initial features confirm that sub-acute oral exposure to this industrial plasticizer monomer initiates rapid, multi-focal destructive processes within the respiratory tissue.

Further detailed examination of the parenchyma in the G2 group under identical magnification confirmed that the inflammatory process led to severe hemodynamic and permeability alterations. The extensive septal thickening was consistently accompanied by the formation of protein-rich fluid blocks within the respiratory spaces and structural matrices (**Fig. 2**).

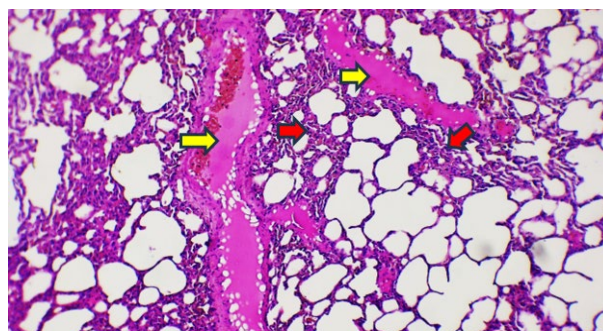


Fig. 2. Histopathological section of the lung from the Bisphenol A exposure group (G2) at 21 days post-exposure, demonstrating increased thickness of the interalveolar connective tissue due to fibrosis and mononuclear cell (MNC) infiltration (red arrows), alongside the accumulation of proteinaceous substance within the alveolar and interstitial spaces (yellow arrows) (H&E stain, $\times 100$)

This histopathological view highlights the severe exudative phase of BPA-induced lung injury. The large, amorphous, highly eosinophilic (bright pink) masses indicated by the yellow arrows represent dense accumulations of proteinaceous material. This material fills the alveolar gaps and invades interstitial borders, effectively blocking gas exchange.

Surrounding these exudative areas, the lung tissue loses its cellular clarity due to the heavy recruitment of immune elements; the red arrows point directly to zones of intense mononuclear cellular (MNC) infiltration and progressive interstitial fibrosis. The presence of these combined lesions indicates that sub-acute toxicity of

Bisphenol A causes severe disruption of the blood-air barrier, leading to critical fluid leakage and structural consolidation of the pulmonary tissue.

The persistent inflammatory pressure in the BPA-only treated mice also induced significant destructive changes in the conducting airways and distal parenchyma. Low-magnification overview confirmed that these lesions had a multi-focal distribution throughout the lung architecture (**Fig. 3**).

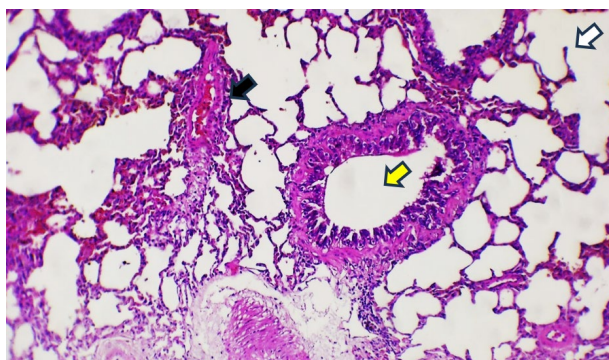


Fig. 3. Histopathological section of the lung from the Bisphenol A exposure group (G2) at 21 days post-challenge, showing perivascular leukocytic infiltration (black arrow) and epithelial desquamation of the adjacent bronchiole (yellow arrow), accompanied by the rupture of alveolar walls (white arrow) (H&E stain, $\times 10$)

When Shilajit was administered concurrently with BPA in the co-treatment group (G3), the pulmonary architecture was substantially preserved. Microscopic examination revealed that regular, thin-walled alveolar networks remained intact across the vast majority of the lung parenchyma, demonstrating a remarkable reduction in both septal thickening and exudative leakage.

Nevertheless, the protective efficacy, while substantial, was not entirely absolute. Localized regions within the tissue sections still displayed modest, well-contained active vascular congestion and mild perivascular mononuclear cell (MNC) infiltration.

Notably, specific areas within the interstitial alveolar fabric revealed a few well-defined, localized granulomatous accumulations. These lesions occurred concurrently with scattered, spherical micro-cavities embedded within the vascular lumens, which structurally resembled the initial stages of fat micro-embolization (**Fig. 4**).

This combined panoramic and high-power view demonstrates the localized tissue responses in the protective treatment model. The black arrow on the wider field ($\times 100$) indicates a zone where active vascular congestion and cellular infiltration remain, proving that while Shilajit efficiently prevents global tissue destruction, focal hemodynamics are still modulated.

The high-resolution inset ($\times 400$) provides critical structural evidence of specialized vascular reactions; the yellow arrow identifies clear, rounded micro-cavities within the restricted vascular tracks. These features match the morphology of early fat micro-emboli, suggesting that the co-treatment protocol triggers a localized,

non-destructive intravascular lipid response during tissue recovery.

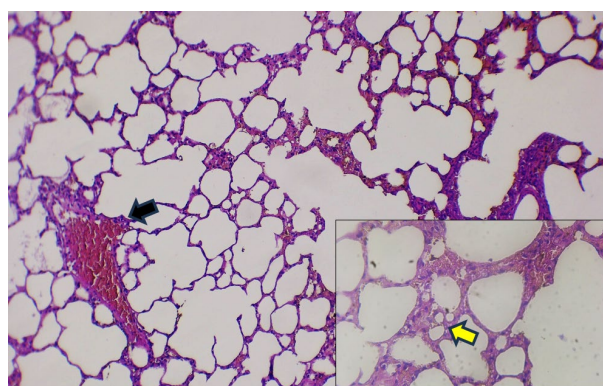


Fig. 4. Histopathological section of the lung from the Bisphenol A + Shilajit co-treatment group (G3) at 21 days post-challenge. The low-magnification background field demonstrates perivascular mononuclear cell (MNC) infiltration accompanied by vascular congestion (black arrow) ($\times 100$), while the high-magnification inset highlights microvascular changes, showing early-stage fat emboli appearing as distinctive rounded holes within the vascular spaces (yellow arrow) ($\times 400$) (H&E stain)

Detailed screening of the pulmonary fabric under higher magnification confirmed the presence of specialized microvascular responses within the interstitial spaces. These features provide clear structural evidence of localized alterations in the distal vascular tracks (**Fig. 5**).

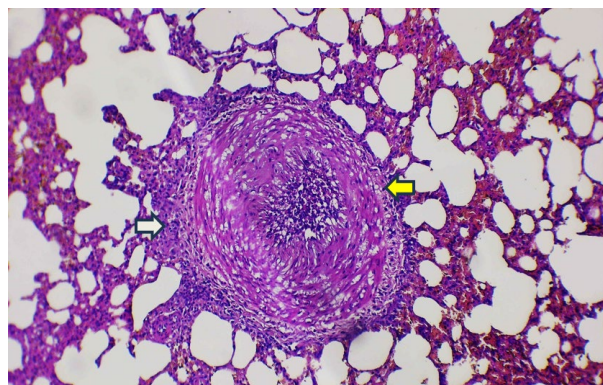


Fig. 5. High-magnification histopathological section of the lung from the Bisphenol A + Shilajit co-treatment group (G3) at 21 days post-challenge, demonstrating the formation of localized fat emboli appearing as distinctive rounded micro-cavities within the restricted vascular tracks (yellow arrow) (H&E stain, $\times 400$)

This microphotograph captures a critical immunomorphic feature of the Shilajit-protected lung tissue. Centrally, a large, clearly defined granulomatous accumulation occupies the interstitial space, serving as evidence of a controlled, localized immune response.

The white arrow identifies the dense surrounding zone marked by heavy perivascular mononuclear cell (MNC) infiltration and active vascular congestion, which

confines the inflammatory process and prevents its diffuse spread through the lung parenchyma. Concurrently, the yellow arrow points to the periphery of this structured focus, where clear, rounded micro-cavities indicate localized fat embolization within the microvascular beds. The structural containment of these lesions confirms that the co-treatment protocol effectively neutralizes the global destructive effects of BPA, substituting generalized parenchymal degradation with organized tissue remodeling.

Table 1
Distribution of histopathological scores across experimental groups (% of animals)

Experimental group	Normal histoarchitecture	Minor modifications	Severe pathological changes
Control Group (G1)	90	10	0
BPA Exposure Group (G2)	10	0%	90
BPA + Shilajit Co-treatment (G3)	70	20	10

In the vehicle control group (G1), 90 % of the animals exhibited completely normal lung morphology, with only 10 % displaying minor, non-specific architectural shifts. Conversely, oral exposure to Bisphenol A in the G2 group resulted in a profound shift in tissue integrity: only 10% of the mice maintained normal architecture, while 90% developed severe, widespread histological abnormalities, confirming a statistically significant induction of targeted pulmonary toxicity.

Concurrent administration of Shilajit in the G3 group led to a remarkable structural recovery. In this co-treated cohort, the proportion of animals exhibiting normal lung histology rose significantly to 70%, while minor modifications were restricted to 20%, and severe pathological degradation was confined to just 10% of the population.

To determine the statistical significance of these distributions, a Kruskal-Wallis test was performed, revealing a highly significant overall difference among the three cohorts ($P<0.05$). Subsequent pairwise comparisons using Dunn's post hoc test confirmed that the histopathological damage scores of the BPA-exposed group (G2) were significantly elevated compared to both the control group (G1) and the Shilajit-protected group (G3). Furthermore, the Shilajit-treated group demonstrated a statistically significant improvement in structural parameters when compared directly to the BPA-only group. To explore the dependency between the therapeutic protocols and tissue outcomes, Fisher's exact test was applied, confirming a highly significant, non-random connection between the specific treatment type and the final distribution of histopathological scores ($P<0.05$).

The histopathological findings of the present study demonstrate that sub-acute oral exposure to Bisphenol A (BPA) induces severe and progressive pulmonary toxicity in a mouse model. This structural deterioration closely aligns with well-established global toxicological assessments. Comprehensive rodent bioassays managed by the National Toxicology Program have structurally documented that systemic BPA exposure leads to diffuse histiocytosis, interstitial hemorrhage, localized pneumonia, and widespread vascular congestion in mammalian lung tissues [6, 7]. Similarly, systemic

Quantitative histopathological scoring and statistical analysis

The qualitative descriptive findings were fully supported by the quantitative histopathological scoring, which demonstrated substantial variations among the experimental groups. To systematically evaluate the degree of pulmonary damage, the distribution of tissue alterations was statistically analyzed across all populations (*Table 1*).

challenges and low-level sub-chronic inhalation of bisphenol monomers trigger persistent inflammation of the upper respiratory architecture and localized epithelial hyperplasia, as compiled in comprehensive regulatory risk assessment reports throughout the European Union [15, 16].

In contrast, the concurrent administration of Shilajit effectively mitigated the development of these severe structural alterations, substantially preserving the primary pulmonary architecture near baseline control parameters [17]. In line with previous animal trials where variant dosages of Shilajit significantly improved weight maintenance, metabolic efficiency, and physiological growth parameters, the current investigation revealed that this traditional phytocomplex successfully maintained the animals' overall growth performance throughout the hazardous chemical exposure window [18].

This comprehensive systemic protection is directly linked to the rich abundance of essential minerals and trace elements naturally embedded within the complex organic matrices of Shilajit, particularly copper, zinc, chromium, and iron. Within modern physiological frameworks, these specific trace elements serve as crucial biological cofactors for key protective enzyme pathways – including superoxide dismutase (SOD) and catalase–thereby reinforcing the endogenous cellular defenses against foreign chemical-induced oxidative damage and subsequent parenchymal destruction [19].

Fulvic acid and humic acid represent the two primary bioactive components of Shilajit that orchestrate its multi-targeted therapeutic efficacy at the cellular level. Fulvic acid actively suppresses the basal lipid peroxidation that systematically degrades pneumocyte cell membranes. By functioning as a potent, low-molecular-weight antioxidant, it readily penetrates lipid barriers to directly neutralize harmful reactive oxygen species (ROS) within the fragile lung parenchyma [20].

Additionally, its robust anti-inflammatory dynamics are strictly mediated by the targeted suppression of pro-inflammatory cytokine pathways, specifically reducing the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). This molecular down-regulation effectively minimizes severe alveolar edema and heavy leukocyte recruitment, preventing the diffuse thickening

of interalveolar septa that clinically compromises pulmonary gas exchange [21].

Conclusions

In conclusion, the present investigation demonstrates that sub-acute oral exposure to Bisphenol A (BPA) at a dose of 400 mg/kg induces profound, widespread structural degradation within the mammalian respiratory architecture, shifting the proportion of normal lung morphology down to just 10% and driving severe pathological abnormalities in 90 % of the affected population. This targeted chemical toxicity is pathomorphologically characterized by diffuse interalveolar septal thickening driven by mononuclear cell (MNC) infiltration, the accumulation of highly eosinophilic proteinaceous exudates, and progressive alveolar wall rupture that causes focal emphysema, thereby severely compromising pulmonary gas exchange. Conversely, concurrent administration of the natural mineral phytocomplex Shilajit (0.5 g/kg) exhibits a robust, statistically verified protective efficacy ($P < 0.05$), successfully restoring normal lung histology in 70% of the animals and restricting severe degradation to only 10 % of the cohort. This significant structural preservation is principally driven by the synergistic antioxidant and anti-inflammatory dynamics of its core bioactive constituents – fulvic and humic acids – which down-regulate pro-inflammatory cytokine pathways (specifically TNF- α and IL-6) and mitigate lipid peroxidation across pneumocyte membranes. Furthermore, the development of well-contained interstitial granulomatous accumulations paired with localized intravascular micro-cavities (resembling early-stage fat micro-emboli) in the co-treated group underscores an active, organized tissue remodeling and defensive immune containment process. Taken together, these mathematically and histologically validated findings confirm the powerful cytoprotective potential of Shilajit, positioning it as an evidence-based natural therapeutic agent capable of safeguarding respiratory health against pervasive environmental pollutants.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The authors confirm that all experimental procedures, husbandry protocols, and studies involving biological objects were planned and conducted in strict accordance with the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1986), Directive 2010/63/EU, national ethical norms, and international standards for the humane treatment of animals (NIH, ARRIVE). The research protocol and experimental scheme were officially reviewed and approved by the Scientific Ethical Committee of the College of Veterinary Medicine / University of Kerbala, Iraq (Approval No. UOK.VET.PA. 2026.182). To minimize animal stress, discomfort, and suffering, all handling, maintaining, and subsequent tissue sampling procedures involving mouse subjects were executed in strict compliance with standard veterinary guidelines,

recommendations of the American Veterinary Medical Association (AVMA), and current international principles of animal welfare.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The author state that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The author expresses sincere gratitude to everyone who contributed to this research and supported the completion of this study.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The author declares that no generative AI or AI-assisted technologies were used during the preparation, writing, translation, or language polishing of this manuscript. The final content was fully authored and reviewed by the researcher, who takes full responsibility for the integrity of the work.

References

1. Manzoor, M. F., Tariq, T., Fatima, B., Sahar, A., Tariq, F., Munir, S., Khan, S., Ranjha, M. M. A. N., Sameen, A., Zeng, X.-A., & Ibrahim, S. A. (2022). An insight into bisphenol A, food exposure and its adverse effects on health: A review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1047827. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1047827>
2. European Chemicals Agency (ECHA). (2015). *Member State Committee support document for identification of bisphenol A as a substance of very high concern due to its endocrine disrupting properties*. European Chemicals Agency.
3. Eid, J. I., Eissa, S. M., & El-Ghor, A. A. (2015). Bisphenol A induces oxidative stress and DNA damage in hepatic tissue of female rat offspring. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 71, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.01.006>
4. Alshahrani, S., Al-Botaty, B., El Morsy, E., & Nofal, S. (2026). Toxicological effects and mechanisms of Bisphenol A exposure: Article review. *Journal of Advanced Pharmacy Research*, 10(1), 54–69. <https://doi.org/10.21608/aprh.2025.414957.1337>
5. National Toxicology Program. (2008). *Toxicology and carcinogenesis studies of bisphenol A (CAS No. 80-05-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies) (NTP TR 545)*. U.S. Department of Health and Human Services.
6. Faheem, N. M., EL Askary, A., & Gharib, A. F. (2021). Lycopene attenuates bisphenol A-induced lung injury in adult albino rats: A histological and biochemical study. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(35), 49139–49152. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14140-w>
7. Shi, Y., Chen, W., Du, Y., Zhao, L., & Li, Q. (2023). Damage effects of bisphenol A against sepsis induced acute lung injury. *Gene*, 878, 147575. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147575>
8. Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L., & Feldman, D. (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132(6), 2279–2286. <https://doi.org/10.1210/endo.132.6.8504731>
9. Gayraud, V., Viguie, C., Cabaton, N., Person, E., Zalko, D., Grandin, F., Berrebi, A., Metsu, D., Toutain, P.-L., & Picard-Hagen, N. (2023). Importance of relative binding of bisphenol A and bisphenol S to plasma proteins for predicting their *in vivo* potencies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 466, 116477. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116477>
10. Shin, B. S., Kim, C. H., Jun, Y. S., Kim, D. H., Lee, B. M., Yoon, C. H., Park, E. H., Lee, K. C., Han, S.-Y., Park, K. L., Kim, H. S., & Yoo, S. D. (2004). Physiologically based pharmacokinetics of bisphenol A. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 67(23-24), 1971–1985. <https://doi.org/10.1080/15287390490514615>

11. Qadir, A., Rehman, S. A., Khan, N., Bedi, B. D. S., Ali, A., & Iqbal, A. (2025). Beyond fulvic acid: A mini-review of the diverse chemical constituents of shilajit. *International Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 15(5), 5150–5159.
12. World Health Organization. (2013). *WHO traditional medicine strategy: 2014–2023*. World Health Organization.
13. Stohs, S. J. (2013). Safety and efficacy of Shilajit (Mumie, Moomiyo). *Phytotherapy Research*, 28(4), 475–479. <https://doi.org/10.1002/ptr.5018>
14. Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (Eds.). (2019). *Bancroft's theory and practice of histological techniques* (8th ed.). Elsevier.
15. Yanagisawa, R., Koike, E., Win-Shwe, T.-T., & Takano, H. (2019). Oral exposure to low dose bisphenol A aggravates allergic airway inflammation in mice. *Toxicology Reports*, 6, 1253–1262. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.012>
16. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). (2014). *Bisphenol A. Part I. Facts and figures on human and environmental health issues and regulatory perspectives* (RIVM Report No. 601351001). Ministry of Health, Welfare and Sport. <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/601351001.html>
17. Meena, H., Pandey, H. K., Arya, M. C., & Ahmed, Z. (2010). Shilajit: A panacea for high-altitude problems. *International Journal of Ayurveda Research*, 1(1), 37–40. <https://doi.org/10.4103/0974-7788.59942>
18. Velmurugan, C., Vivek, B., Wilson, E., Bharathi, T., & Sundaram, T. (2012). Evaluation of safety profile of black shilajit after 91 days repeated administration in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 210–214. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(12\)60043-4](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(12)60043-4)
19. Bhattacharya, S. K., Sen, A. P., & Ghosal, S. (1995). Effects of shilajit on biogenic free radicals. *Phytotherapy Research*, 9(1), 56–59. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650090113>
20. Zykova, M. V., Trofimova, E. S., Azarkina, L. A., Lasukova, T. V., Mihalyov, D. A., Drygunova, L. A., Danilets, M. G., Ligacheva, A. A., Tsupko, A. V., Bashirov, S. R., & Belousov, M. V. (2025). Pharmacological effects of humic substances and their signaling mechanisms. *Molecules*, 31(1), 114. <https://doi.org/10.3390/molecules31010114>
21. Winkler, J., & Ghosh, S. (2018). Therapeutic potential of fulvic acid in chronic inflammatory diseases and diabetes. *Journal of Diabetes Research*, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/5391014>

ORCID

M. A. Hussein 

<https://orcid.org/0009-0002-7429-6767>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Impact of seasonal variation on foal estrus breeding success in mares in Iraq

Y. M. Rasheed  | S. H. Ghareeb | M. Y. Mahmood

Article info

Correspondence Author

Y. M. Rasheed

E-mail:

yaseen.m@uodiyala.edu.iq

College of Veterinary
Medicine, University of
Diyala,
Al-Muradia, Old Baghdad-
Baqubah Road, Baqubah,
32001, Diyala, Iraq

Citation: Rasheed, Y. M., Ghareeb, S. H., & Mahmood, M. Y. (2026). Impact of seasonal variation on foal estrus breeding success in mares in Iraq. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 168–173. doi: 10.31210/spi2026.29.02.24

This study aimed to evaluate the influence of seasonal variations on foal estrus breeding success in mares in Iraq by analyzing pregnancy rates and preovulatory follicular diameters across four distinct seasons over a calendar year. The investigation was conducted at the Veterinary Clinic of the College of Veterinary Medicine, University of Diyala, Iraq, and involved forty-seven lactating mares aged between 5 and 14 years. Follicular dynamics, cyclicity patterns, and preovulatory follicle sizes were monitored via transrectal palpation followed by ultrasonographic examinations using a portable ultrasound scanner equipped with a 5.0–8.5 MHz multi-frequency linear transducer, performed by a single operator from day 7 until day 13 postpartum. All mares were naturally bred during the foal heat on days 9, 11, and 13 postpartum, and pregnancy diagnosis was confirmed between days 15 and 40 after the final breeding session via the visualization of the embryonic vesicle or early embryo. The results demonstrated that the mean preovulatory follicular diameters peaked significantly during autumn (37.9 ± 2.17 mm) and summer (37.6 ± 2.06 mm) compared to winter (34.1 ± 1.59 mm) and spring (33.6 ± 1.84 mm) ($P \leq 0.05$), with the least significant difference value established at 3.081. Concurrently, seasonal shifts exerted a highly significant effect on breeding outcomes ($P = 0.0087$), yielding an overall pregnancy rate of 57.45 %. The highest pregnancy success was recorded during summer (66.67 %) and spring (65.00 %), followed by autumn (50.00 %), whereas the winter season exhibited a severe reproductive decline, characterized by the lowest pregnancy rate (37.50 %) and a corresponding peak in non-pregnancy outcomes (62.50 %). The study concludes that regional seasonal climatic conditions act as primary drivers of equine fertility, heavily favoring warmer and photo-stimulated periods. These findings underscore the necessity of integrating strategic seasonal planning and management into local equine breeding programs to optimize reproductive performance and minimize the economic losses associated with failed breeding attempts in unfavorable seasons.

Keywords: mares, seasonal variations, pregnancy rate, follicular diameter, ultrasonography, Iraq.

Вплив сезонних коливань на успішність запліднення кобил у період першої післяродової охоти в Іраку

Я. М. Рашид | С. Г. Гаріб | М. Ю. Махмуд

Факультет ветеринарної
медицини, Університет
Діяли,
м. Баакуба, Ірак

Це дослідження мало на меті оцінити вплив сезонних коливань на успішність розведення кобил у період післяродової охоти в Іраку шляхом аналізу показників вагітності та діаметра преовуляторних фолікулів у різні сезони року. Дослідження проводили на базі ветеринарної клініки факультету ветеринарної медицини Університету Діяла, Ірак. Дослідну вибірку склали 47 лактуючих кобил віком від 5 до 14 років. Динаміку фолікулів, особливості циклічності та розміри преовуляторних фолікулів контролювали за допомогою ректальної пальпації з наступним ультразвуковим дослідженням портативним ультразвуковим апаратом, оснащеним багаточастотним лінійним датчиком із частотою 5,0–8,5 МГц. Дослідження виконував один оператор із 7-го по 13-й день післяродового періоду. Усі кобили були осіменені природним шляхом під час першої післяродової охоти на 9-й, 11-й та 13-й день після вижереблення, а діагностику вагітності підтверджували в період між 15-м і 40-м днями після останнього осіменіння шляхом візуалізації ембріона на ранніх стадіях розвитку. Результати продемонстрували, що середні діаметри преовуляторних фолікулів досягали свого піку восени ($37,9 \pm 2,17$ мм) та влітку ($37,6 \pm 2,06$ мм), що було суттєво більше порівняно із зимою ($34,1 \pm 1,59$ мм) та весною ($33,6 \pm 1,84$ мм) ($P \leq 0,05$), при цьому значення найменшої істотної різниці становило 3,081. Водночас сезонні зміни виявили високозначущий вплив на результати розведення ($P = 0,0087$), забезпечивши загальний показник вагітності на рівні 57,45 %. Найвищу запліднювальну ефективність кобил зафіксовано влітку (66,67 %) та навесні (65,00 %), далі восени (50,00%), тоді як взимку спостерігалася різке зниження репродуктивної функції, що характеризувалося найнижчим показником вагітності (37,50 %). Взимку зафіксовано найбільшу кількість незапліднених кобил (62,50 %). Отримані результати свідчать, що регіональні сезонні кліматичні умови є ключовими чинниками, які впливають на репродуктивну функцію кобил, із вираженою інтенсифікацією фізіологічних процесів у теплі періоди з подовженим світловим днем. Отримані результати підкреслюють необхідність інтеграції стратегічного сезонного планування та менеджменту в місцеві програми розведення коней з метою оптимізації репродуктивних показників і мінімізації економічних збитків, пов'язаних із невдалими спробами запліднення у менш сприятливі сезони.

Ключові слова: кобили, сезонні коливання, вагітність, діаметр фолікула, ультрасонографія, Ірак.



Бібліографічний опис для цитування: Рашид Я. М., Гаріб С. Г., Махмуд М. Ю. Вплив сезонних коливань на успішність запліднення кобил у період першої післяродової охоти в Іраку. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 168–173.

Introduction

The reproductive efficiency of mares plays a crucial role in the success of equine breeding programs. Estrus, ovulation, and conception rates are influenced by a range of intrinsic and extrinsic factors, among which seasonal variation is one of the most impactful. Understanding how changes in photoperiod, temperature, and humidity across the seasons affect reproductive behavior and physiology in mares is essential for optimizing breeding management, especially in regions with distinct climatic shifts such as Iraq [1].

In seasonal breeders like horses, reproductive activity is closely aligned with environmental stimuli. Changes in daylength and temperature regulate the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis, which in turn modulates estrous cyclicity and ovulatory patterns. Studies across various breeds and climates have demonstrated significant variations in gestational length, ovulation timing, and pregnancy success across seasons [2, 3]. These physiological responses are particularly relevant in countries characterized by extreme weather differences between summer and winter.

Mares generally exhibit increased reproductive activity during spring and early summer due to longer daylight hours, which stimulate follicular development and ovulation. Conversely, during the shorter daylight periods of late autumn and winter, mares may enter a transitional or anovulatory state, leading to reduced or absent estrous cycles [4, 5]. This seasonal reproductive suppression has been documented in both natural and controlled breeding environments.

Similar observations have been made in horses bred in southern climates, where spring and summer yield more consistent pregnancy rates than winter or autumn [3, 6]. These findings underscore the necessity of synchronizing breeding programs with favorable environmental windows.

In subtropical climates, such as India, researchers have observed that postpartum estrus and early ovarian activity are more pronounced during warmer months, contributing to higher foal-heat conception rates [7, 8]. Iraq's geographical and climatic conditions share distinct similarities with such subtropical regions, raising critical questions about how seasonal variations impact local mare fertility rates. Seasonal shifts influence not only reproductive hormones and follicular dynamics but also exert broader physiological and behavioral effects. This highlights the multifactorial nature of seasonal breeding performance.

Following parturition, the first postpartum estrus, commonly known as the foal heat or foal estrus, occurs approximately 7 to 14 days after foaling and is frequently exploited by breeders for early rebreeding. However, conception rates achieved during this period can fluctuate significantly depending on the season [6, 9].

In Central and Eastern Europe, research conducted by [10] emphasized how fluctuating environmental conditions across seasons alter ovulation intervals, estrus duration, and pregnancy rates. These data reinforce the necessity of region-specific reproductive studies, as environmental influences can differ even within

similar latitudes due to local ecological factors. Iraq, with its arid summers and cold winters, remains underrepresented in this body of literature.

In conclusion, the synchronization between environmental aspects and reproductive behavior in mares is well-established in the global literature [11–14]. However, regional studies remain indispensable due to geographic specificity. The findings of this research will contribute significantly to the body of knowledge on equine reproduction in the Middle East and will serve as a practical guide for enhancing breeding success through seasonally informed management strategies.

Given the lack of comprehensive data from Iraq, there is a critical need to understand how distinct regional climatic factors influence equine reproduction in this area. Investigating these patterns across spring, summer, autumn, and winter is essential for establishing region-specific management frameworks and improving local mare fertility rates.

The aim of the study

The aim of this study was to evaluate the impact of seasonal variations on estrous behavior, follicular diameter, and pregnancy success in mares, thereby identifying the optimal breeding windows and providing actionable, science-based recommendations for Iraqi horse breeders.

Materials and methods

Animals

The present study was conducted at the Veterinary Clinic of the College of Veterinary Medicine, University of Diyala, Diyala, Iraq, and involved forty-seven lactating mares aged between 5 and 14 years, according to owner records. The investigation spanned four consecutive seasons over a one-year period. Mares that had lost their foals within the first week postpartum were also included in the study cohort. All forty-seven mares were bred during the foal estrus on days 9, 11, and 13 postpartum. Throughout the study, the animals were continuously maintained on a standardized diet consisting of grain-based concentrate and green fodder.

Ultrasonographic examinations

At each postpartum scanning session, transrectal palpation was performed first, followed by transrectal ultrasonographic (US) examination from day 7 until day 13 postpartum. These examinations were conducted to monitor follicular development, determine preovulatory follicle diameter, and ultrasonographically assess the presence of endometrial folds and uterine mucus. Pregnancy diagnosis was performed between days 15 and 40 after the last breeding session via the visualization of the embryonic vesicle or the early embryo [9]. All ultrasonographic evaluations were performed by a single operator using a portable V10 ultrasound scanner (China) equipped with a 5.0–8.5 MHz multi-frequency linear transducer, following the established protocol described by [15]. Mares with

ovarian follicles measuring less than 25 mm in diameter were classified as anestrus (acyclic), whereas mares presenting with follicles between 25 and 30 mm were considered cyclic [14].

Statistical analysis

Data were analyzed using the Statistical Analysis System (SAS, version 9.4) software program to evaluate the effects of seasonal variations on follicular diameter and pregnancy outcomes (pregnant vs. non-pregnant mares). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed, and the Least Significant Difference (LSD) test was utilized to compare differences between mean values. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results and discussion

The influence of seasonal variations on reproductive parameters in mares demonstrated distinct patterns across the four studied seasons.

Analysis of follicular development during the foal estrus revealed that the mean follicular diameter peaked during autumn (37.9 ± 2.17 mm) and summer (37.6 ± 2.06 mm). These values were significantly greater ($P \leq 0.05$) compared to the smaller diameters recorded during spring (33.6 ± 1.84 mm) and winter (34.1 ± 1.59 mm), with the Least Significant Difference (LSD) value established at 3.081 (*Fig. 1*).

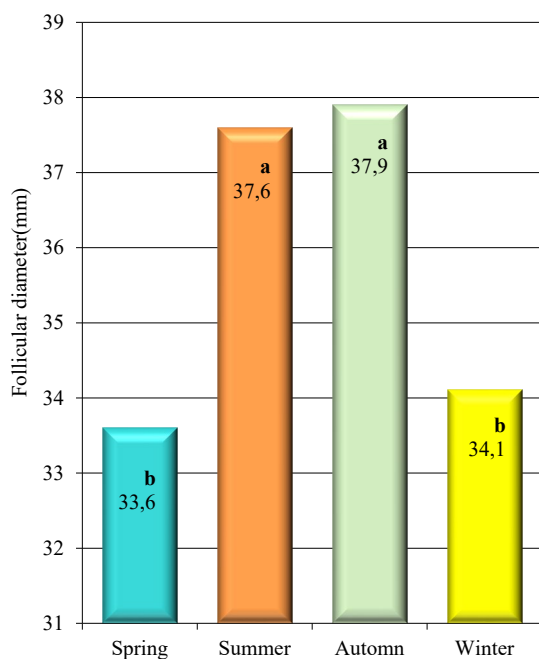


Fig. 1. Mean follicular diameter (mm) of mares during foal estrus across different seasons.

Note: Columns marked with different letters (a, b) differ significantly ($P \leq 0.05$) based on the Least Significant Difference (LSD) test.

Concurrently, seasonal shifts exerted a highly significant effect on breeding outcomes ($P = 0.0087$), with warmer seasons yielding enhanced reproductive efficiency (*Table 1*).

Table 1.

Effect of seasonal variations on pregnancy and non-pregnancy rates in mares bred during foal estrus

Season	No. of breedings	Pregnant (%)	Non-pregnant (%)
Spring	20	13/20 (65.00)	7/20 (35.00)
Summer	9	6/9 (66.67)	3/9 (33.33)
Autumn	10	5/10 (50.00)	5/10 (50.00)
Winter	8	3/8 (37.50)	5/8 (62.50)
Total	47	27/47 (57.45)	20/47 (42.55)
Statistical	---	P = 0.0087	

Note: Statistical significance was determined at $P \leq 0.05$.

The highest pregnancy rates were achieved during summer (66.67 %) and spring (65.00 %), whereas the winter season was characterized by the lowest conception success (37.50 %) and a corresponding peak in non-pregnancy rates (62.50 %). The overall pregnancy rate across the entire study population stood at 57.45 %, underscoring the suppressive impact of colder winter conditions on equine fertility.

Taken together, these results demonstrate a clear synchronicity between ovarian dynamics and overall breeding efficiency in mares. The significant increase in preovulatory follicular diameter during the warmer and transitional light periods (summer and autumn) correlates with higher conception success. Conversely, the reduction in follicular size during winter corresponds with a pronounced decline in pregnancy rates. This statistical alignment confirms that seasonal climatic factors are primary drivers of reproductive performance in this geographic region, establishing a baseline for comparative analysis.

Seasonal variation plays a pivotal role in determining reproductive outcomes in mares, as evidenced by the current findings from Iraq. The data revealed distinct differences in follicular diameter and pregnancy success across the four seasons during the foal estrus, with warmer seasons demonstrating improved reproductive metrics. This pattern underscores the biological sensitivity of equine reproductive physiology to environmental conditions, particularly temperature and photoperiod [10]. In the current study, a statistically significant difference in pregnancy rates was observed across seasons ($P < 0.01$). The overall pregnancy rate for mares bred during the foal heat was 57.45 %, which closely aligns with the 57.90 % and 56.80 % reported in previous literature [7, 16].

In contrast, significantly higher pregnancy rates of 81.00 % have been recorded in mares bred during the foal heat under different conditions [17]. These discrepancies might be attributable to the relatively low number of mares in our study, as well as variations in reproductive management practices [18]. In this context, higher pregnancy rates in previous reports may also be explained by the application of artificial breeding techniques compared to the natural breeding methods employed in the present study. Artificial management can substantially reduce intrauterine fluid accumulation in postpartum mares, thereby enhancing fertility outcomes [19].

Conversely, some literature has reported substantially lower foal heat conception rates of 46.60 % [9, 20], 39.28 % [21], and 20.00 % [22] compared to the findings

of the present study. The superior pregnancy rates observed in our results compared to these lower historical data could be ascribed to minimal intrauterine fluid retention, a low concentration of inflammatory cells, and rapid, early uterine involution. Nonetheless, it is worth noting that some researchers have documented lower conception rates accompanied by high embryonic mortality in mares bred at the foal heat, even in the absence of obvious pathological conditions [23–25].

In the current study, it was observed that follicular development and pregnancy rates were notably enhanced during summer and spring, while winter proved less favorable. These findings align with multiple studies indicating that photoperiod and temperature shifts modulate hormonal cycles and fertility outcomes in equines [26, 27].

Interestingly, despite similar follicular diameters observed in summer and autumn, the pregnancy success differed markedly between these two seasons. Summer achieved the highest pregnancy rate at 66.67 %, while autumn recorded only 50.00 %. This discrepancy suggests that while follicular size is important, it is not the sole determinant of conception success. Other factors, such as uterine receptivity, oocyte quality, and environmental stressors, may significantly contribute to the variability in outcomes [14, 24]. Concurrently, literature suggests that autumn represents a transitional phase where reproductive efficiency begins to decline [10]. This period may reflect the early onset of photoperiod-induced regression, characterized by a subtle reproductive decline beginning in late autumn.

In spring, the mean follicular diameter was significantly smaller (33.6 ± 1.84 mm) than in summer and autumn, yet the pregnancy rate remained relatively high (65.00 %). This indicates that while spring follicles may be smaller, they are still fully capable of producing viable oocytes and supporting successful conception. Such a pattern is consistent with prior research, which documented favorable reproductive outcomes during the spring in subtropical climates despite moderate follicular measurements [23].

Conversely, winter presented the most unfavorable conditions for reproduction, exhibiting both a smaller average follicular diameter (34.1 ± 1.59 mm) and the lowest pregnancy rate (37.50 %). Statistical testing confirmed the significance of this seasonal suppression. Previous physiological models explain that during winter, mares experience reduced estrous behavior, diminished luteinizing hormone surges, and increased melatonin levels, which collectively contribute to decreased fertility [11].

Interestingly, while the present results strongly support the impact of seasonal variations, they also point to individual mare factors that may modulate reproductive outcomes. For instance, certain mares achieved successful pregnancy despite presenting with smaller preovulatory follicles, comparable to the sizes characteristically recorded during the winter and spring months. This observation aligns with prior findings, which documented significant individual variability in reproductive

efficiency among animals maintained within the same herd and managed under identical environmental conditions [28].

Conclusions

This study demonstrates a significant seasonal influence on the preovulatory follicular dynamics and breeding efficiency of mares during the foal estrus in Iraq. The mean follicular diameter peaked during autumn (37.9 ± 2.17 mm) and summer (37.6 ± 2.06 mm), which was significantly larger ($P \leq 0.05$) than the measurements recorded in winter (34.1 ± 1.59 mm) and spring (33.6 ± 1.84 mm). Concurrently, seasonal shifts profoundly affected pregnancy outcomes ($P = 0.0087$). Against an overall study pregnancy rate of 57.45%, the highest breeding success was achieved during summer (66.67 %) and spring (65.00 %), whereas the winter season exhibited a severe reproductive decline with the lowest pregnancy rate of 37.50 % and a corresponding peak in non-pregnancy outcomes (62.50 %). These quantified metrics confirm that despite the regional subtropical climate, local mares remain highly sensitive to environmental stimuli, establishing spring and summer as the statistically optimal windows for maximizing equine fertility.

Practical recommendations

Optimization of Foal Heat Utilization: To achieve the target reproductive efficiency of one foal per mare per year and maximize the reproductive potential of the herd, breeding programs should systematically utilize the foal estrus as a tool to enhance overall fertility.

Strategic Breeding Scheduling: Equine breeding schedules in Iraq should strictly prioritize the spring and summer months. This alignment maximizes conception efficiency and significantly reduces the economic burden associated with failed breeding attempts during less favorable seasons.

Directions for Future Research: Future investigations should incorporate endocrine profiling (specifically monitoring estradiol and progesterone levels) alongside ultrasonographic evaluations and breeding outcomes. This multi-parametric approach will provide a deeper, more mechanistic understanding of the observed seasonal differences in equine fertility.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The authors declare that all experimental procedures and diagnostic manipulations in this study were conducted in strict accordance with the internationally accepted guidelines for the care and use of laboratory and agricultural animals, including Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of September 22, 2010, on the protection of animals used for scientific purposes. The clinical part of the research complied fully with the national regulations and ethical standards governing veterinary practices and animal welfare in Iraq. Prior to any ultrasonographic examinations or veterinary procedures, official written informed consent was obtained from all mare owners. Throughout the

investigation, the mares were provided with appropriate housing, standard balanced nutrition, quality veterinary care, and total minimization of stress, pain, or any discomfort.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The authors state that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors express their sincere gratitude to everyone who contributed to this research and supported the completion of this study.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The authors declare that no generative AI or AI-assisted technologies were used during the preparation, writing, translation, or language polishing of this manuscript. The final content was fully authored and reviewed by the researchers, who take joint responsibility for the work.

References

- Rasheed, Y. M., & Ghareeb, S. H. (2018). Impact of ultrasonographic monitoring in reproductive efficiency of mares during months of year in Iraq. *Diyala Agricultural Sciences Journal*, 10, 255–264. <https://journal.djas.uodiyala.edu.iq/index.php/dasj/article/view/3548>
- Reilas, T., Virtala, A.-M., & Katila, T. (2014). Gestation lengths of Finnhorse and Standardbred mares in Finland: effects of breeding season and reproductive status. *Pferdeheilkunde*, 30(1), 45–51. <https://doi.org/10.21836/pem20140107>
- Lazim, E. H., & Al-Watar, B. D. (2025). Ultrasonographic detection of fetal sexing in nanny goat. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 39(1), 1–7. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2024.153995.3915>
- King, S. S., Douglas, B. L., Roser, J. F., Silvia, W. J., & Jones, K. L. (2010). Differential luteolytic function between the physiological breeding season, autumn transition and persistent winter cyclicity in the mare. *Animal Reproduction Science*, 117(3–4), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.012>
- Rasheed, Y. M., Khalaf, F. H., & Mohammed, S. N. (2023). Assessment of fetal sex determined and eye diameter to detection of gestational age in mares by ultrasonography. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 37(Supplement I-IV), 129–134. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2023.1375080.2691>
- Blanchard, T. L., Thompson, J. A., Love, C. C., Brinsko, S. P., Ramsey, J., O'Meara, A., & Varner, D. D. (2012). Influence of day of postpartum breeding on pregnancy rate, pregnancy loss rate, and foaling rate in Thoroughbred mares. *Theriogenology*, 77(7), 1290–1296. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.034>
- Sharma, S., Morel, M. C. G. D., & Dhaliwal, G. S. (2010). Factors affecting the incidence of postpartum oestrus, ovarian activity and reproductive performance in Thoroughbred mares bred at foal heat under Indian subtropical conditions. *Theriogenology*, 74(1), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.018>
- Ali, M. K., & Alirazi, O. M. (2025). Ultrasound evaluation of colic in horses: Diagnosis and severity assessment. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 39(1), 43–51. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2024.152675.3825>
- Lazim, E. H., Aziz, D. M., & Rahawy, M. A. (2022). Transabdominal ultrasonographic determination of pregnancy and fetal viability in mares. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 36(3), 791–796. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2022.132142.2054>
- Vilhanová, Z., Novotný, F., Valocký, I., Hura, V., Horňáková, P., & Karamanová, M. (2021). Effect of seasonal environmental changes on selected reproductive parameters in mares. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 24(2), 208–218. <https://doi.org/10.15547/bjvm.2019-0083>
- Voigt, U. (2020). *Influence of weather parameters on the fertility of horse mares (Equus caballus)* [Doctoral dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen].
- Spencer, K. M., Podico, G., Megahed, A. A., Jones, K. L., Bittar, J. H. J., & Canisso, I. F. (2022). Ovulatory response to GnRH agonist during early and late fall in mares. *Theriogenology*, 185, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.03.003>
- Cardona-García, M., Jiménez-Escobar, C., Ferrer, M. S., & Maldonado-Estrada, J. G. (2024). Follicular dynamics and pregnancy rates during foal heat in Colombian Paso Fino mares bred under permanent grazing. *Animals*, 14(5), 760. <https://doi.org/10.3390/ani14050760>
- Mahmood, K., Hassan, M., Channa, A. A., Ghafoor, A., & Riaz, A. (2024). Comparative analysis of breeding patterns and reproductive efficiency of mares in subtropical conditions of Pakistan. *Veterinary Medicine and Science*, 10(5), e1582. <https://doi.org/10.1002/vms3.1582>
- Omran, S. N., & Rasheed, Y. M. (2013). Optimal post-breeding interval for pregnancy diagnosis in mares by using ultrasonographic technique. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 37(2), 206–210. <https://doi.org/10.30539/iraqijvm.v37i2.293>
- Yendim, S. K., Aksan, O. U., Yildirim, S., Uzabaci, E., Sarıoglu, S., Yıldız, G. E., Keskin, A., & Yilmazbas-Mecitoglu, G. (2025). The evaluation of fertility following foal heat or the subsequent postpartum estrus in purebred Arabian mares. *Indian Journal of Animal Research*, 59(8), 1303–1309. <https://doi.org/10.18805/IJAR.BF-1929>
- Brummer, J. E., Brady, H. A., & Blanchard, T. L. (2002). Uterine involution, day and variance of first postpartum ovulation in mares treated with progesterone and estradiol-17 β for 1 or 2 days postpartum. *Theriogenology*, 57(2), 989–995. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00703-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00703-8)
- Alamaary, M., Al-Sobayil, F., & Ali, A. (2014). Reproductive performance of Arab mares in the Kingdom of Saudi Arabia. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere*, 42(3), 145–149. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1623222>
- Ishii, M., Aoki, T., Yamakawa, K., Magata, F., Gojo, C., Ito, K., Kayano, M., & Nambo, Y. (2013). Relationship between the placental retention time and the reproductive performance at the foal heat in Thoroughbred and a comparison with heavy draft. *Journal of Equine Science*, 24(2), 25–29. <https://doi.org/10.1294/jes.24.25>
- Aoki, T., Yamakawa, K., & Ishii, M. (2013). Factors affecting gestation length in heavy draft mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(6), 437–440. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.07.011>
- Akourki, A., Echegaray, A., Falceto, M. V., & Mitjana, O. (2017). Factors influencing reproductive efficiency and pregnancy in Pura Raza Española mares. *Veterinarni Medicina*, 62(4), 186–191. <https://doi.org/10.17221/205/2015-vetmed>
- Mahal, J. S., Honparkhe, M., Kumar, A., & Singh, P. (2020). Conception rates following breeding at foal heat versus induced heat in postpartum indigenous mares. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(4), 1904–1907. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.904.225>
- Suchitra, B. R., Dinesh, N. M., Yathish, H. M., Anil Kumar, M. C., & Chandrasekhara Murthy, V. (2023). Age related effect on pregnancy rate and pregnancy wastage in thoroughbred mares bred during different heat cycles postpartum under subtropical conditions. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 93(4), 349–352. <https://doi.org/10.56093/ijans.v93i04.124643>
- Lane, E. A., Bijnen, M. L. J., Osborne, M., More, S. J., Henderson, I. S. F., Duffy, P., & Crowe, M. A. (2016). Key factors affecting reproductive success of thoroughbred mares and stallions on a commercial stud farm. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(2), 181–187. <https://doi.org/10.1111/rda.12655>
- Rose, B. V., Firth, M., Morris, B., Roach, J. M., Wathes, D. C., Verheyen, K. L. P., & de Mestre, A. M. (2018). Descriptive study of current therapeutic practices, clinical reproductive findings and incidence of pregnancy loss in intensively managed thoroughbred mares. *Animal Reproduction Science*, 188, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.11.011>
- Ginther, O. J., Gastal, E. L., Gastal, M. O., & Beg, M. A. (2004). Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Animal Reproduction*, 1(1), 31–44.

27. Çil, B., Orkun, K., Şahin, M. O., & Sayım, A. A. (2025). Preovulatory follicle size and reproductive parameters in Arabian mares: A comprehensive analysis. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 13(5), 1123–1129. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v13i5.1123-1129.7687>
28. Dutra, G. A., Ishak, G. M., Pechanova, O., Pechan, T., Peterson, D. G., Jacob, J. C. F., Willard, S. T., Ryan, P. L., Gastal, E. L., & Feugang, J. M. (2019). Seasonal variation in equine follicular fluid proteome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17, 29. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0473-z>

ORCID

Y. M. Rasheed 
S. H. Ghareeb 
M. Y. Mahmood 

<https://orcid.org/0000-0003-0881-8360>
<https://orcid.org/0000-0001-5237-8695>
<https://orcid.org/0000-0001-6020-6201>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Molecular detection and descriptive epidemiology of fowl adenovirus infection in broiler chickens

Z. A. A. Al-Talabani✉

Article info

Correspondence Author

Z. A. A. Al-Talabani

E-mail:

zainab.a.a@uodiyala.edu.iq

College of Veterinary
Medicine, University of
Diyala,
Al-Muradia, Old Baghdad-
Baqubah Road, Baqubah,
32001, Diyala, Iraq**Citation:** Al-Talabani, Z. A. A. (2026). Molecular detection and descriptive epidemiology of fowl adenovirus infection in broiler chickens. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 174–182. doi: 10.31210/spi2026.29.02.25

Fowl adenoviruses represent substantial viral pathogens distributed across poultry sectors globally, being etiologically linked with severe disease complexes that induce devastating economic losses in broiler production. This study was conducted to establish definitive molecular evidence of fowl adenovirus infection in commercial broiler chickens within the Diyala Governorate using an optimized real-time polymerase chain reaction framework and to mathematically model its regional distribution boundaries. For this purpose, a total number of 96 clinical liver tissue specimens were aseptically collected from 32-day-old broiler chickens displaying clinical indications of hepatic dysfunction across various private operations. Following tissue processing and lysis, viral genomic DNA was isolated using standard silica-membrane extraction matrices. Molecular screening was executed via a qualitative real-time PCR (qRT-PCR) platform utilizing specific oligonucleotide primers (L1-F: 5'-GACGGCATTGGGGAGGAATT-3' and L1-R: 5'-GCTGAGGATTGAGCTTCACCC-3') targeting the hypervariable loop L1 region of the viral hexon gene, followed by a continuous post-amplification dissociation gradient analysis from 58°C to 95°C. Out of the total number of examined specimens, 20 samples returned positive diagnostic outcomes, establishing a regional viral infection prevalence rate of 20.8%. Descriptive statistical variance modeling successfully projected the true expected prevalence limits within a stable 95% confidence interval ranging from 12.7% to 28.9%, maintaining an estimated standard error of 4.14. Furthermore, a non-parametric Chi-square goodness-of-fit test demonstrated an intense, highly significant deviation from theoretical uniform frequencies ($\chi^2 = 32.66$, $df = 1$, $P < 0.001$), determining a powerful localized infectious pressure across the regional poultry ecosystem despite the statistical predominance of negative samples (79.2%). The recorded kinetic amplification plots manifested rapid exponential fluorescence signal emergence between cycles 15 and 22, while melt curve evaluation demonstrated sharp, singular dissociation peaks centered at approximately 85°C, validating absolute amplicon specificity and confirming the total absence of primer-dimer artifacts or non-specific carryover products. These empirical data determine that fowl adenovirus circulation is firmly established at a substantial frequency within the regional poultry networks, confirming that real-time PCR remains an exceptionally rapid, high-fidelity, and dependable diagnostic screening tool for early epidemiological mapping.

Keywords: fowl adenovirus, real-time PCR, molecular prevalence, descriptive epidemiology, broiler chickens.

Молекулярна детекція та описова епідеміологія інфекції пташиного аденовірусу у курей-бройлерів

З. А. А. Аль-Талабани

Факультет ветеринарної
медицини, Університет
Діялі,
м. Баакуба, Ірак

Пташині аденовіруси належать до епідеміологічно важливих вірусних патогенів, широко поширених у промисловому птахівництві в усьому світі, та є етіологічними факторами низки тяжких захворювань, що завдають суттєвих економічних збитків господарствам бройлерного типу. Це дослідження було проведено з метою встановлення чітких молекулярних доказів наявності збудника пташиного аденовірусу у курчат-бройлерів у комерційних господарствах провінції Діяла за допомогою оптимізованої полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, а також математичного моделювання меж його регіонального поширення. Для цього септично відібрано 96 клінічних зразків тканин печінки від 32-добових курчат-бройлерів із клінічними ознаками печінкової дисфункції на різних приватних підприємствах. Після обробки та лізису тканин вірусну геномну ДНК ізолювали за допомогою стандартних екстракційних матриць на основі силікагелевих мембран. Молекулярний скринінг виконували за допомогою платформи якісної ПЛР у реальному часі з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів (L1-F: 5'-GACGGCATTGGGGAGGAATT-3' та L1-R: 5'-GCTGAGGATTGAGCTTCACCC-3'), спрямованих на гіперваріабельну ділянку петлі L1 гена гексону вірусу, з подальшим безперервним аналізом градієнта дисоціації після ампліфікації від 58°C до 95°C. Дослідженнями встановлено, що із загальної кількості досліджуваних зразків 20 вивилися позитивно реагуючими, що дало змогу встановити регіональний рівень поширеності вірусної інфекції на рівні 20,8 %. Описове статистичне моделювання дисперсії успішно спрогнозувало межі істинного очікуваного поширення в межах стабільного 95 % довірчого інтервалу від 12,7 до 28,9 % при розрахунковій стандартній похибці 4,14. Крім того, непараметричний критерій згоди Хі-квадрат продемонстрував інтенсивне, високозначуще відхилення від теоретичних рівномірних частот ($\chi^2 = 32,66$, $df = 1$, $P < 0,001$), визначаючи високу активність циркуляції патогену в регіональній системі птахівництва, попри статистичне переважання негативних зразків (79,2 %). Зафіксовані кінетичні графіки ампліфікації продемонстрували швидку експоненціальну появу сигналу флуоресценції між 15 і 22 циклами, тоді як оцінка кривої плавлення виявила чіткі, поодинокі піки дисоціації, центровані приблизно на 85°C, що підтверджує абсолютну специфічність амплікону та повну відсутність артефактів праймер-димерів або неспецифічних продуктів переносу. Отримані дані визначають, що циркуляція пташиного аденовірусу чітко встановлена зі значною частотою в регіональних птахівничих мережах, підтверджуючи, що ПЛР у реальному часі залишається винятково швидким, високоточним і надійним інструментом діагностичного скринінгу для раннього епідеміологічного картування.

Ключові слова: пташиний аденовірус, ПЛР у реальному часі, молекулярна поширеність, описова епідеміологія, курчата-бройлери.**Бібліографічний опис для цитування:** Аль-Талабани З. А. А. Молекулярна детекція та описова епідеміологія інфекції пташиного аденовірусу у курей-бройлерів. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 174–182.

Introduction

Fowl adenoviruses (FAdVs) are significant non-enveloped, double-stranded DNA viral pathogens that belong to the family *Adenoviridae* and are known to infect a wide range of avian species globally. In commercial poultry production, these viruses are etiologically linked to several economically devastating diseases, most notably inclusion body hepatitis (IBH), hydropericardium syndrome (HPS), and severe avian gizzard erosion [1]. Outbreaks of fowl adenovirus infection can lead to profound economic distress in commercial broiler chicken operations due to sudden spikes in flock mortality, poorly developed growth performance parameters, reduced body weight gain, compromised feed conversion efficiency, and generalized immunosuppression that dramatically elevates the susceptibility of the birds to secondary bacterial or viral pathogens [2].

Based on their distinct molecular, structural, and antigenic properties, fowl adenoviruses are officially classified into five distinct species, designated from *Fowl aviadenovirus A* to *Fowl aviadenovirus E*, all belonging to the genus *Aviadenovirus*. The pathogenicity, clinical manifestations, and specific tissue tropisms vary extensively among the different serotypes within these species. For instance, strains belonging to FAdV-4 are recognized as the primary etiological agents responsible for hydropericardium syndrome, which causes high mortality and severe fluid accumulation in the pericardial sac, whereas specific serotypes such as FAdV-8a, FAdV-8b, and FAdV-11 have been heavily implicated as the main causative agents of inclusion body hepatitis in poultry flocks worldwide [3].

Adenovirus entry into susceptible host cells is initiated through a coordinated two-step process, beginning with targeted attachment to surface receptors, which is rapidly followed by structural internalization via receptor-mediated endocytosis. Once inside the intracellular compartment, the virion is systematically transported toward the host cell nucleus, where genomic DNA replication and active transcription take place [4]. Following structural genome translocation, the replication cascade is chronologically programmed by the synchronized synthesis of early regulatory and late structural proteins, which are essential for viral DNA duplication and correct capsomeric assembly. In avian hosts, the advanced progression of this intracellular replication cycle ultimately triggers profound cellular injury and localized tissue necrosis, manifesting predominantly as severe gross and microscopic lesions within the target liver and spleen tissues of infected broiler chickens [5].

It is well established that the liver serves as the primary target organ for fowl adenovirus replication in chickens, reflecting the highly hepatotropic nature of these pathogens. Infected poultry flocks display a variety of characteristic micro- and histopathological lesions during post-mortem examination, including diffuse hepatocellular necrosis, severe degeneration of hepatocytes, hepatic inflammation, and the formation of

prominent basophilic intranuclear inclusion bodies within the affected liver cells [6]. Due to rapid systemic viral dissemination via the bloodstream and the intense immune suppression caused by structural damage to lymphoid tissues, fowl adenovirus infections also frequently spread to cause severe degenerative alterations and apoptotic changes within the splenic tissues [7].

Fowl adenovirus infections have been increasingly reported on commercial poultry operations globally, threatening sustainable animal production. The high prevalence and rapid spread of these disease outbreaks are significantly exacerbated by inadequate biosecurity measures on farms, poor sanitary regimes, intense environmental stressors, and synergistic co-infections with other avian immunosuppressive pathogens, such as the infectious bursal disease virus. Consequently, ensuring early, highly sensitive molecular diagnosis remains a paramount prerequisite for the success of preventative management strategies and control programs in commercial poultry production [8].

Given the lack of comprehensive molecular data from Iraq, there is a critical need to understand the circulation of fowl adenovirus within intensive poultry operations in the Diyala Governorate. Investigating these distribution patterns via targeted molecular tools is essential for establishing reliable regional diagnostic data and managing infection risks in commercial broiler facilities [1].

The aim of the study

The aim of this study was to molecularly detect fowl adenovirus infection in broiler chickens using a targeted Real-Time PCR platform and to analyze the apparent prevalence and cycle threshold (Ct) distribution patterns across hepatic tissue samples collected from 32-day-old broiler chickens.

Materials and methods

Sample collection and clinical screening

A total of 96 liver tissue samples were collected from young commercial broiler chickens at 32 days of age, obtained from various private poultry farms located across the Diyala province. Slices of hepatic tissue were systematically extracted from birds that were clinically suspected of harboring avian adenovirus disease based on flock-level parameters, including acute depression, uneven growth, and varying degrees of hepatomegaly or pale liver discoloration observed during preliminary post-mortem screenings [9]. To establish a rigorous differential profile and confirm the viral etiology behind these suspicious hepatic manifestations, all clinical specimens were gathered under strict aseptic conditions using pre-sterilized surgical tools to prevent external cross-contamination. Immediately following dissection, each tissue specimen was placed into an individual sterile container, properly labeled, and instantly transferred into a specialized thermal icebox maintaining a temperature of approximately 4°C for rapid and secure transportation to the molecular biology laboratory for further diagnostic verification.

Tissue processing and homogenization

In the laboratory setting, the processing of the collected liver specimens was conducted within a certified laminar flow cabinet to maintain a completely sterile environment. Approximately 25 to 50 mg of each individual liver tissue sample was carefully dissected and sliced into small fragments using sterile instruments. The finely minced tissue fragments were subsequently transferred into sterile containers containing cold, sterile phosphate-buffered saline (PBS) or a specialized extraction lysis buffer, and thoroughly homogenized to establish a uniform, consistent tissue suspension optimized for downstream nucleic acid isolation. To separate the target viral particles from large host cellular debris, the resulting tissue homogenates were subjected to centrifugation for 5 minutes. The clear supernatant was carefully collected and immediately subjected to viral genomic DNA extraction [10].

Viral DNA extraction

The isolation of viral genomic DNA from the previously clarified liver tissue supernatants was executed using the commercial EasyPure® Viral DNA/RNA Kit, strictly adhering to the specialized extraction protocols and guidelines provided by the manufacturer. Briefly, the extraction pipeline involved efficient chemical lysis of viral envelopes and capsids, followed by the selective adsorption of nucleic acids onto silica-membrane minicolumns. After serial washing steps to remove potential enzymatic inhibitors, cellular proteins, and residual salts, the highly purified viral DNA templates were eluted in nuclease-free elution buffer. The concentration and structural purity of the isolated DNA were immediately quantified using spectrophotometric analysis, and the templates were subsequently stored in labeled microcentrifuge tubes at a constant temperature of -20°C to preserve genomic stability until downstream molecular amplification.

Oligonucleotide primers and target region

For the molecular screening and specific detection of fowl adenovirus DNA, a set of published oligonucleotide primers targeting the hypervariable loop L1 region of the viral hexon gene was utilized. The forward and reverse primer sequences synthesized for this study were designated as follows:

L1-F (Forward): 5'-GACGGCATTGTTGGGGAGGAATT-3'
L1-R (Reverse): 5'-GCTGAGGATTGAGCTTCACCC-3'

These specific primer sequences were selected to ensure the universal amplification of a conserved diagnostic fragment within the hexon gene locus across circulating fowl aviadenovirus species, yielding an expected distinct amplicon size suitable for qualitative evaluation [2].

Qualitative real-time PCR (qRT-PCR) amplification protocol

The molecular detection and qualitative profiling of fowl adenovirus genomic DNA were carried out on a high-performance Real-Time thermal cycler system utilizing fluorescent SYBR Green chemistry.

The amplification assays were executed in optical-grade PCR reaction wells containing genomic region-specific oligonucleotide primers. The amplification reaction was performed in a standardized final volume, consisting of the extracted viral DNA template, the optimized forward and reverse primers, a commercial SYBR Green master mix containing Taq DNA polymerase, dNTPs, and structural reaction buffers, and filled to the final volume with nuclease-free water.

The thermal cycling profile programmed for the optimal amplification of the target hexon gene fragment consisted of an initial denaturation step at 95°C for 5 minutes to fully activate the hot-start polymerase enzyme and ensure the complete denaturation of the double-stranded DNA templates. Following this initial step, the reaction mixture was subjected to 40 continuous amplification cycles under the following regulated parameters: denaturation at 95°C for 30 seconds to separate the newly synthesized strands, primer annealing at 60°C for 30 seconds to allow specific primer attachment to the target L1 locus, and extension at 72°C for 30 seconds for optimal nucleotide polymerization. A final terminal extension step was executed at 72°C for 1 minute to complete the synthesis of any partial amplicons. Fluorescence intensity signals resulting from the accumulation of the targeted PCR products were recorded automatically by the optical sensors of the thermal cycler system at the end of each extension phase. Positive samples were definitively identified based on the emergence of characteristic sigmoidal amplification curves crossing the mathematically calculated baseline threshold line within defined threshold cycle (Ct) values.

To rigorously evaluate the physical specificity of the resulting amplicons and verify the absence of any technical artifacts, a post-amplification melt curve analysis (dissociation curve analysis) was systematically performed immediately following the completion of the 40 cycling phases. The dissociation protocol was executed across a continuous temperature gradient rising from 58°C to 95°C , with simultaneous monitoring of fluorescence decrease. The resulting dissociation profiles were evaluated to confirm that clear, singular melting temperature (T_m) peaks appeared exclusively at the expected thermal point of the target gene fragment, demonstrating that no non-specific genomic amplifications were produced and confirming the total absence of primer-dimer artifacts or external contamination within the reaction matrices.

Statistical analysis and descriptive epidemiological modeling

The empirical raw datasets generated from the qualitative real-time PCR diagnostic screenings were subjected to rigorous non-parametric and descriptive statistical processing using IBM SPSS Statistics software. The baseline regional molecular distribution of fowl adenovirus was mathematically expressed as an apparent prevalence percentage, calculated by dividing the total frequency of confirmed positive instances by the overall number of examined specimens ($n = 96$). To project the mathematical stability of the sampling distribution and evaluate variance boundaries, the estimated standard error

was defined, and the limits of the true expected regional prevalence were modeled within a strict 95 % confidence interval (CI bounds).

To evaluate whether the observed frequencies of positive and negative molecular outcomes deviated significantly from a theoretical uniform distribution model predicated upon equal probability (50/50 null hypothesis), a non-parametric Chi-square (χ^2) goodness-of-fit test was applied to the operational matrices. The mathematical weight contributions of individual cells were accumulated to compute the final test metric, with the statistical degrees of freedom ($df = 1$) and the corresponding asymptotic significance values (P) determined accordingly. Statistical significance thresholds throughout all modeled epidemiological parameters were strictly fixed at a confidence level of $P < 0.05$.

Results and discussion

Fowl adenovirus detection and baseline distribution

The molecular screening of clinical specimens using a targeted qualitative Real-Time PCR (qRT-PCR) platform provided baseline epidemiological data regarding the circulation of the viral pathogen across intensive poultry farming networks within the region. Out of the total cohort of liver tissues gathered from suspected broiler flocks displaying clinical indications of hepatic dysfunction, a notable portion of the population tested positive for the presence of the fowl adenovirus genomic DNA. The definitive breakdown of the diagnostic screening outcomes, including the total sample frequencies and the corresponding detection rates, is systematically structured in [Table 1](#).

Table 1
Epidemiological distribution and detection rates of fowl adenovirus in clinical liver specimens, n=96

Diagnostic screening parameter	Frequencies of tested samples	Detection rate, %
Positive samples (FAdV-DNA detected)	20	20.8
Negative samples (FAdV-DNA not detected)	76	79.2
Total evaluated cohort	96	100.0

The diagnostic outcomes demonstrate a significant regional circulation of fowl adenovirus within the intensive broiler production sectors of the governorate. Although the clear majority of the screened suspected birds were ultimately confirmed to be uninfected, the discovery that more than one-fifth of the evaluated flock cohort actively harbored the viral hexon gene highlights a persistent biosecurity threat. This baseline detection level confirms that aviadenovirus infection is not an isolated or sporadic event, but rather a established epidemiological entity within local commercial operations. Furthermore, the substantial proportion of negative outcomes among clinically suspected birds indicates a complex etiology for general hepatitis signs on local farms, reinforcing the conclusion that subjective post-mortem gross observations are insufficient for

definitive diagnosis and highlighting the absolute necessity of utilizing highly sensitive molecular assays to prevent misidentification.

To evaluate the replication intensity and determine the geometric scale of viral colonization within the target hepatic cells, a comprehensive analysis of the generated cycle threshold (Ct) values was executed across the positive cohort. The monitored amplification cycles provided an indirect quantitative assessment of the initial viral nucleic acid concentration, established upon the physical principle that the onset of exponential fluorescence signals shares a strict inverse proportional correlation with the baseline target DNA template copy number. To characterize the severity of the infection profiles, the confirmed positive instances were systematically stratified into distinct classification ranges reflecting high, moderate, or low viral load parameters. The definitive breakdown of this kinetic distribution and its corresponding biological interpretations are detailed in [Table 2](#).

Table 2
Quantitative stratification of fowl adenovirus viral loads based on kinetic cycle threshold (Ct) profiles, n=20

Cycle threshold (Ct) range	Biomolecular interpretation	Frequency of positive samples / %
15.0 – 20.0	High viral load (elevated nucleic acid concentration)	18 / 90
20.1 – 25.0	Moderate viral load (intermediate nucleic acid concentration)	2 / 10
25.1 – 30.0	Low viral load (minimal nucleic acid concentration)	0

The kinetic stratification reveals an overwhelming predominance of advanced, high-density replication profiles among the infected commercial poultry individuals. The finding that the vast majority of the positive clinical specimens triggered exponential signal emergence well before the twentieth thermal cycle indicates an intense state of active viral duplication and massive genomic accumulation within the hepatic parenchyma. Conversely, intermediate replication profiles were rarely encountered, and cases of low-level or trace viral presence were entirely absent from the analyzed dataset. This uniform trend toward elevated target DNA concentrations suggests that the circulating fowl adenovirus strain exhibits high replication efficiency, or that the evaluated broiler chickens were sampled during the acute, peak phase of the clinical disease process, during which hepatocellular destruction and viral shedding reach their maximum biological velocity.

Mathematical Modeling and Descriptive Epidemiology

To map the definitive epidemiological boundaries of the infection and determine the mathematical reliability of the survey within the regional poultry networks, a rigorous descriptive statistical evaluation was performed

on the raw screening frequencies. This mathematical characterization focused on establishing the variance boundaries and calculating the standard error to project the potential viral circulation dynamics beyond the immediate sample pool. By defining the limits of variance and modeling the ratio parameters, the dataset provides a standardized framework for regional disease forecasting. The consolidated descriptive statistical parameters generated from the total evaluated broiler cohort are structured in *Table 3*.

Table 3
Descriptive epidemiological parameters and variance modeling of fowl adenovirus detection

Descriptive statistical parameter	Modeled mathematical value
Total evaluated sample size (n)	96
Confirmed positive frequency	20
Confirmed negative frequency	76
Calculated apparent prevalence	20.8 %
Estimated standard error	4.14
95% confidence interval (CI bounds)	12.7–28.9 %
Modeled positive-to-negative ratio	1 : 3.8

The descriptive configuration patterns illustrate that the infection is firmly anchored at a substantial mathematical frequency within the local poultry ecosystem. The calculated standard error reflects a highly stable sampling distribution, which directly validates the accuracy of the overall screening methodology. Most importantly, the calculated lower and upper boundaries of the 95% confidence interval mathematically demonstrate that if similar commercial broiler flocks under identical production pressures were surveyed within the region, the true viral prevalence would consistently fall within this defined range of 12.7 % to 28.9 %. This mathematical modeling firmly refutes any assumption that fowl adenovirus is a transient or minor threat, confirming instead that the pathogen exerts a constant, uniform infectious pressure across more than one-fourth of the local commercial poultry population at any given time.

Non-parametric modeling and goodness-of-fit evaluation

To evaluate whether the observed distribution of positive and negative diagnostic frequencies deviates significantly from a theoretical uniform distribution, a non-parametric Chi-square goodness-of-fit test was applied to the dataset. This mathematical analysis modeled the actual laboratory frequencies against an expected null-hypothesis framework predicated upon an equal probability distribution profile. The comprehensive non-parametric parameter configuration, reflecting the individual cell weight contributions and the final accumulated test metric, is systematically structured in *Table 4*.

The non-parametric statistical evaluation demonstrates an intense, mathematically validated deviation from the theoretical uniform distribution model. The high accumulated empirical test value ($\chi^2 = 32.66$, $df = 1$) confirms that the predominant frequency

of uninfected individuals over active viral cases is statistically highly significant ($P < 0.001$), thereby firmly rejecting the random variation hypothesis.

Table 4
Chi-square analysis and empirical weight modeling of qualitative real-time PCR outcomes

qRT-PCR result	Observed number	Expected number	Chi-square contribution
Positive	20	48	16.33
Negative	76	48	16.33
Total	96	96	32.66

From a veterinary epidemiology perspective, the extreme weight contribution generated by both operational groups emphasizes that while negative outcomes statistically dominate the flock population, the persistent identification of active viral replication remains highly alarming. This clear statistical imbalance indicates that while the absolute majority of birds successfully avoided clinical colonization, the virus exerts a substantial, uniform infectious pressure within the commercial poultry ecosystem, necessitating strict molecular monitoring protocols regardless of high baseline negative sample frequencies.

Real-time amplification kinetics and curve analysis

The qualitative validation of the generated fluorogenic datasets was established by analyzing the continuous geometric monitoring profiles recorded during the thermal processing phases. The real-time tracking of the accumulation of the targeted hexon gene fragments provided definitive biomolecular evidence regarding the polymerization velocity and execution efficiency of the assay across the clinical samples. The characteristic kinetic configurations, representing the exponential progression of active viral DNA amplification alongside the completely non-reactive baseline references, are systematically displayed in *Fig. 1*.

The kinetic configuration patterns illustrate a highly reproducible and specific synchronization during the enzymatic polymerization phase. The emergence of classical, well-defined sigmoidal profiles crossing the mathematically calculated baseline threshold line within a uniform window between cycles 15 and 22 confirms successful targeted duplication of the viral DNA in 20 confirmed positive specimens. The steep, vertical shift observed in these fluorescence intensity curves reflects optimal primer annealing and high enzymatic efficiency of the polymerase chain reaction. Conversely, uninfected negative controls and the remaining non-reactive clinical specimens from the total cohort of 96 samples remained completely flat, preserving a steady horizontal line well below the critical threshold limit throughout the entire 40-cycle sequence. This absolute lack of signal elevation mathematically rules out the presence of non-specific carryover artifacts or primer-dimer interference during data logging, validating the reliability of the baseline setup and confirming an overall viral detection rate of 20.8 % across the investigated broiler chicken population.

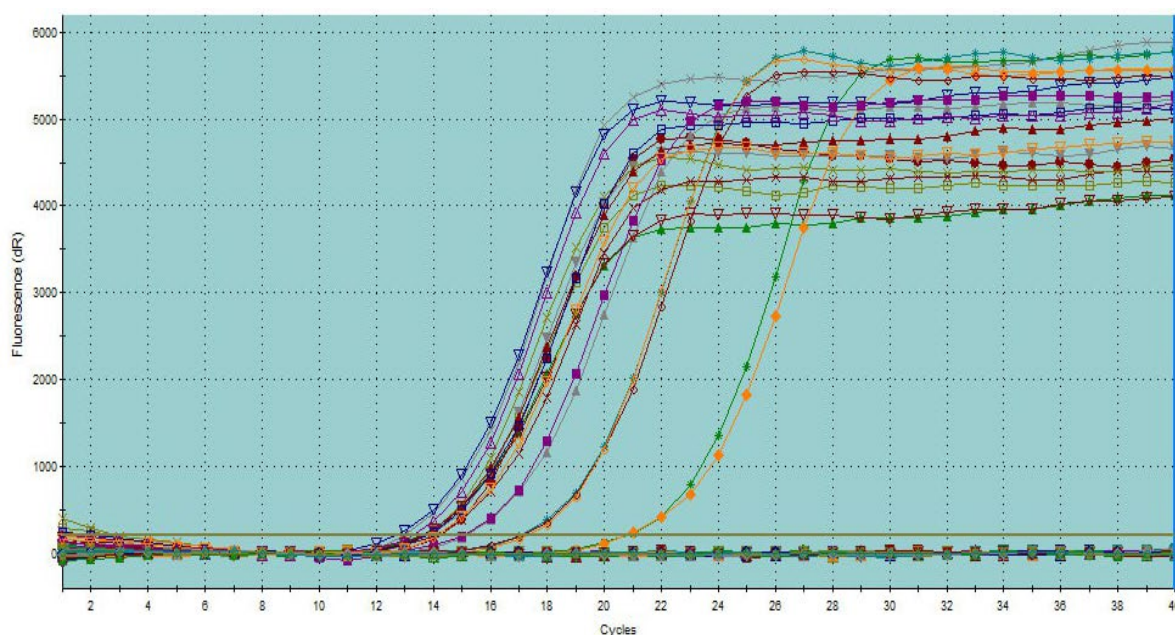


Fig. 1. Real-time polymerase chain reaction amplification plots of fowl adenovirus positive samples

Dissociation profiling and amplicon specificity analysis

To rigorously verify the thermodynamic purity and physical homogeneity of the generated nucleic acid products, a post-amplification melt curve analysis was performed across all reactive wells immediately following thermal cycling [11]. Monitoring the precise temperature at which the double-stranded DNA

amplicons denature into single strands provides a reliable non-gel method to evaluate target validation and confirm enzymatic accuracy. The resulting dissociation profiles, representing the singular thermal melting curves of the targeted L1 hexon gene fragment alongside the absence of any non-specific reaction artifacts, are systematically illustrated in **Fig. 2**.

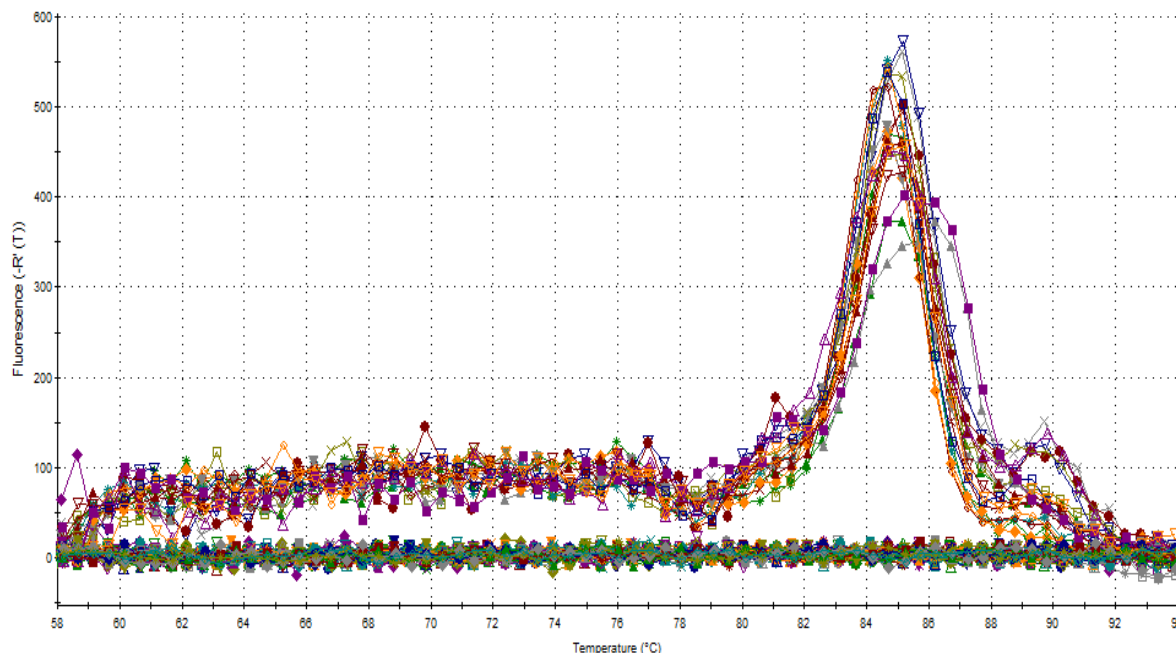


Fig. 2. Post-amplification dissociation profiles and melt curve analysis of fowl adenovirus positive specimens

The thermodynamic dissociation patterns demonstrate a highly specific and uniform amplification profile across the evaluated clinical matrices. The emergence of a singular, sharp melting peak occurring exclusively at a highly specific melting temperature region between 84°C and 86°C, centered at approximately 85°C, reflects a completely homogeneous PCR product population.

This uniform thermal stability indicates that the oligonucleotide primers successfully locked onto the specific target sequence without creating mismatched hybrid structures. Furthermore, the complete flatness of the baseline across lower temperature ranges mathematically demonstrates the absolute absence of non-specific amplification products, primer-dimer artifacts,

or external genomic contamination during the thermal profiling phase, establishing the high diagnostic fidelity of the molecular screening protocol.

The successful molecular detection of fowl adenovirus genomic DNA in clinical liver specimens via a targeted qualitative real-time PCR platform underscores the persistent circulation and epidemiological importance of this pathogen within local commercial poultry production networks. The documented apparent prevalence rate of 20.8% established in the current investigation provides clear, empirical evidence that the virus actively circulates within the evaluated broiler chicken population in the region. These data strongly indicate that fowl adenovirus continues to represent a highly significant, threatening viral pathogen capable of compromising sustainable animal production and inducing severe economic stress within modern commercial poultry management systems.

The epidemiological patterns and pathological trends observed in our dataset share close biological alignment with the findings reported by Schachner et al. [2]. Our results further support the comprehensive investigations of Tamam et al. [12], who demonstrated that infectious fowl adenovirus strains are heavily distributed across commercial broiler operations and manifest a tight etiological association with destructive macro- and microscopic liver lesions linked directly to severe inclusion body hepatitis (IBH) outbreaks, localized lymphoid depletion, severe immunosuppression, and elevated mortality rates within intensive production systems. Furthermore, the frequent and highly stable isolation of viral DNA from hepatic samples confirms that the liver parenchyma must be regarded as the primary biological target organ for fowl adenovirus colonization and replication, directly matching the classic hepatotropic nature of the genus *Aviadenovirus* established during comprehensive transmission profiles by Hess [7].

The specific infection rate documented in the current study (20.8 %) is also in highly consistent alignment with the baseline molecular observations published by Marek et al. [3]. In their multi-center molecular diagnostic surveys, prevalence rates ranging between 18 % and 27 % were frequently encountered within infected broiler chicken flocks. They demonstrated that subclinical or acute viral circulation is highly influenced by deficient biosecurity standards and poor microclimate management practices on localized private farms, which significantly accelerate the regional transmission dynamics and active circulation of the virus among susceptible bird cohorts.

From a diagnostic methodology perspective, the execution kinetics recorded in our real-time PCR assay are technically supported by the universal validation trials conducted by Günes et al. [13]. They verified that real-time PCR platforms targeting specific hexon loci exhibit exceptional sensitivity, analytical accuracy, and high specificity for the rapid screening of poultry tissues. The dynamic behavior of the amplification curves logged in our investigation, which consistently manifested distinct exponential fluorescence signals between thermal cycles 15 and 22, closely mirrors the rapid amplification kinetics,

low threshold cycle characteristics, and enzymatic efficiency documented in their standardized optimization models.

Furthermore, the significant infection parameters established in the current screening are heavily corroborated by the epidemiological reports of Toro et al. [14]. Their research established that clinical and subclinical aviadenovirus infections on commercial meat-type chicken operations are frequently driven by inadequate husbandry systems, intensive immune-suppressive stressors, high stocking densities, and mixed co-infections with other avian pathogens. These overlapping operational factors and management deficiencies help explain the high frequency of positive molecular outcomes detected across the evaluated private facilities in this study. To address these management-driven challenges, Mittal et al. [15] verified that advanced molecular diagnostic profiling and phylogenetic characterization targeting specific fowl adenovirus strains provide the necessary analytical framework for tracking field outbreaks of inclusion body hepatitis (IBH) and hydropericardium syndrome under compromised rearing conditions. Their molecular evaluations demonstrated that isolating and identifying specific viral genomic fragments directly from infected target tissues remains an essential tool to monitor regional pathogen distribution and evaluate structural variations within intensive poultry operations.

The diagnostic performance and physical specificity of our qualitative profiling are in complete accordance with the methodology validated by Kardoudi et al. [16], who confirmed that real-time PCR coupled with high-resolution melting curve analysis represents an optimal, high-fidelity molecular framework to rapidly detect and differentiate fowl adenovirus DNA directly from infected avian liver and hepatic tissues.

In contrast to the parameters documented in the current survey, our baseline prevalence data differ from the outcomes published by Elbestawy et al. [17], who recorded a substantially higher infection rate exceeding 40% in commercial broiler networks in Egypt. Such elevated regional detection rates are typically associated with catastrophic clinical outbreaks, the presence of localized vaccination failures, or the rapid geographic spread of highly virulent endemic viral strains. Conversely, the apparent prevalence established in our study was notably lower than the epidemic parameters documented by Zia et al. [18] in Pakistan, who reported extensive pathogen distribution and heightened detection rates during intense field outbreaks of hydropericardium hepatitis syndrome in industrial broilers. These continuous variations in epidemiological parameters are common in veterinary survey literature and are primarily driven by localized differences in sample size configurations, distinct environmental conditions, seasonal shifts, and variations in localized biosecurity management systems. Ultimately, the implementation of continuous, high-throughput genomic typing frameworks combined with robust monitoring of viral shedding dynamics during pathogen interactions remains the most

critical requirement to control serotype diversification and mitigate the long-term economic impact of evolving fowl adenovirus strains within commercial poultry networks [19, 20].

Conclusions

Fowl adenovirus circulation was firmly established through definitive molecular confirmation within commercial poultry networks in the region. Out of the total number of examined specimens consisting of 96 clinical liver samples collected from young broiler chickens, a targeted real-time PCR platform identified a regional infection positivity rate of 20.8 % (with 20 samples returning positive diagnostic outcomes), while descriptive statistical modeling projected the true expected prevalence limits within a 95 % confidence interval of 12.7 % to 28.9 %. Non-parametric test analysis demonstrated a highly significant deviation from uniform frequencies ($\chi^2 = 32.66$, $df = 1$, $P < 0.001$), indicating a strong infectious pressure despite the statistical predominance of negative samples.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The author confirms that the studies were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), national bioethical norms, and international standards for the humane treatment of animals. The research protocol and sampling design were formally reviewed and approved by the Ethics Committee of the College of Veterinary Medicine at the University of Diyala, Iraq (Approval No. Vet Medicine (251) from January, 2026, Z). The clinical liver tissue specimens investigated in this research were recovered exclusively from deceased or suspected broiler chicken cases during routine diagnostic, post-mortem, and sanitary screening for fowl adenovirus detection.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The author states that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The author gratefully acknowledges the council of the College of Veterinary Medicine at Diyala University for providing institutional support throughout this research project.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The author declares that no generative AI or AI-assisted technologies were used during the preparation, writing, translation, or language polishing of this manuscript. The final content was fully authored and reviewed by the researcher, who takes full responsibility for the integrity of the work.

References

1. Al-Obaidy, A. T., Al-Azzawi, A. K., & Al-Bayati, A. J. (2026). Exploring hydropericardium hepatitis syndrome (HHS) in broiler chickens: A comprehensive clinical and histopathological study in Diyala governorate. *Diyala Journal for Veterinary Sciences*, 3(4), 27–49. <https://doi.org/10.71375/djvs.2025.03403>
2. Schachner, A., Matos, M., Grafl, B., & Hess, M. (2017). Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control – a review on the current global situation. *Avian Pathology*, 47(2), 111–126. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1385724>
3. Marek, A., Günes, A., Schulz, E., & Hess, M. (2010). Classification of fowl adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon L1 gene region. *Journal of Virological Methods*, 170(1-2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.09.019>
4. Ruan, S., Zhao, J., He, Z., Yang, H., & Zhang, G. (2018). Analysis of pathogenicity and immune efficacy of fowl adenovirus serotype 4 isolates. *Poultry Science*, 97(8), 2647–2653. <https://doi.org/10.3382/ps/pey113>
5. Niczyporuk, J. S. (2017). Molecular characterisation of fowl adenovirus type 7 isolated from poultry associated with inclusion body hepatitis in Poland. *Archives of Virology*, 162(5), 1325–1333. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3240-5>
6. Thaeer, W., & Al-Azzawi, A. (2025). Histopathological investigation of fowl adenovirus (FAdV) infections in broiler chickens: A study in Diyala governorate. *Diyala Journal for Veterinary Sciences*, 3(1), 48–67. <https://doi.org/10.71375/djvs.2025.03104>
7. Hess, M. (2013). Aviadenovirus infections. In D. E. Swayne (Ed.), *Diseases of poultry* (13th ed., pp. 290–300). Wiley-Blackwell.
8. Abd El-Fatah, A. H., Samir, M., Ali, M. M., Afify, A., Shehata, O. S., & AlKhazindar, M. (2025). Infectious bursal disease virus a comprehensive review of challenges and advances in poultry health. *Egyptian Journal of Chemistry*, 161–181. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2025.366754.11422>
9. OIE. (2021). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health (WOAH), Paris, France.
10. Haque, Md. E., Islam, T. R., Sigma, S. H., Hossain, Md. G., Hayat, S., Hossain, M. T., & Islam, Md. A. (2024). Pathological investigation, molecular characterization and first-time isolation of the predominant serotypes of fowl adenovirus (FAdV-D and E) from commercial poultry in Bangladesh. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1490255. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1490255>
11. Islam, Md. M., Nadia, Mst. M. A., Islam, Md. R., Islam, Md. S., Sunny, S. A., Islam, M., Sultana, S., & Alam, Md. J. (2026). Fowl adenovirus infections: A comprehensive review of prevalence, pathogenesis, diagnosis, control, and economic impact. *Poultry Science*, 105(4), 106565. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2026.106565>
12. Tamam, S. M., Yahya, M. H., Hussein, A. S., Alenazi, N., Alghamdi, A. N., Abdel-Moneim, A. S., & Ewies, S. S. (2025). Molecular and pathological characterization of fowl adenovirus serotype 2 linked to inclusion body hepatitis in broiler chickens. *Microbial Pathogenesis*, 209, 108097. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.108097>
13. Günes, A., Marek, A., Grafl, B., Berger, E., & Hess, M. (2012). Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of fowl adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E). *Journal of Virological Methods*, 183(2), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.04.005>
14. Toro, H., Gonzalez, C., Cerda, L., Hess, M., Reyes, E., & Geisse, C. (2000). Chicken anemia virus and fowl adenoviruses: association to induce the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome. *Avian Diseases*, 44(1), 51–58. <https://doi.org/10.2307/1592507>
15. Mittal, D., Jindal, N., Tiwari, A. K., & Khokhar, R. S. (2013). Characterization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens. *Virus Disease*, 25(1), 114–119. <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0183-7>
16. Kardoudi, A., Benani, A., Kichou, F., Ouchhour, I., Erafi, K., & Fellahi, S. (2025). Evaluation of clinical, analytical, and genotyping performance of Hex L1 real-time PCR coupled with high-resolution melting curve analysis for fowl adenovirus outbreak investigation in Morocco. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1654833. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1654833>

17. Elbestawy, A., Ibrahim, M., Hammam, H., Noreldin, A., Bahrawy, A., & Ellakany, H. (2020). Molecular characterization of fowl adenovirus D species in broiler chickens with inclusion body hepatitis in Egypt. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 64(1), 110–117. <https://doi.org/10.5455/ajvs.74411>
18. Zia, N., Maqbool, A., Safdar, M., Habiba, U. I., Mehmood, A., Muhammad, U., Iqbal, Z., Iqbal, J., Mehmood, S., Khan, A., & Umar, S. (2019). Detection and phylogeny of fowl adenovirus associated with hydropericardium hepatitis syndrome in broilers. *Pakistan Journal of Zoology*, 51(6), 2091–2098. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.6.2091.2098>
19. Peng, L., Liu, M., Cheng, M. C., & Chen, H. W. (2026). Characterization of fowl adenovirus isolates in Taiwan: genome, antigenicity, and pathogenicity. *Veterinary Research*, 57(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s13567-026-01793-z>
20. Shosha, E. A. E., Eldaghayes, I., Abdel-Rahaman, S. E. A., Hussein, A., El Naggar, H. M., Gamaleldin, M. A., Fotouh, A., & Radwan, A. A. (2026). Pathogenicity and genotyping of fowl adenovirus-D serotype 2/11 circulating in commercial broilers in Egypt. *Viruses*, 18(2), 252. <https://doi.org/10.3390/v18020252>

ORCID

Z. A. A. Al-Talabani 

<https://orcid.org/0009-0007-7673-8799>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Molecular basis of fertility variation in cryopreserved bull semen: Functional evaluation and expression analysis of *IZUMO1*, *PLCζ*, and *CatSper* genes

A. K. Abdulla  | O. H. Harran

Article info

Correspondence Author

A. K. Abdulla

E-mail:

alaa.abdulla@qu.edu.iqCollege of Biotechnology,
University of Al-Qadisiyah,
Al-Jamiaa District,
Ad Diwaniyah, 58001,
Al-Qadisiyah,
Iraq**Citation:** Abdulla, A. K., & Harran, O. H. (2026). Molecular basis of fertility variation in cryopreserved bull semen: Functional evaluation and expression analysis of *IZUMO1*, *PLCζ*, and *CatSper* genes. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 183–192. doi: 10.31210/spi2026.29.02.26

Semen cryopreservation serves as a pivotal biotechnological tool implemented in artificial insemination programs to accelerate genetic progress in cattle breeding. However, the freeze-thawing cycle can heavily compromise fertilization efficiency due to sublethal cellular, functional, and molecular injuries. This study aimed to evaluate the impacts of cryopreservation on conventional semen parameters and the relative transcript abundance of fertility-associated target genes (*CatSper*, *IZUMO1*, and *PLCζ*) utilizing straws from high-fertility and low-fertility breeding bulls. A retrospective cohort comprising 92 post-thaw semen samples (50 high-fertility and 42 low-fertility) was investigated. Sperm motility kinetics were quantified via Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA), while structural viability, plasma membrane integrity, and normal cytormorphology were determined using Eosin-Nigrosin exclusion, hypoosmotic swelling tests, and Diff-Quik staining, respectively. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was executed to evaluate relative gene expression normalized against the reference gene *GAPDH*, based on the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ methodology. The spermogram analysis demonstrated a statistically significant downregulation in directional progressive motility (62.7 % vs. 65.4 %; $P=0.011$), structural viability (78.5 % vs. 80.2 %; $P=0.045$), and membrane permselectivity (72.2 % vs. 74.6 %; $P=0.045$) in the low-fertility group, accompanied by a suppression in normal sperm morphology (73.7 % vs. 78.1 %; $P=0.0001$). Conversely, overall total sperm motility displayed no significant statistical variance between the cohorts (74.0 % vs. 77.9 %; $P=0.063$). At the molecular level, all three target transcripts exhibited profound downregulations in the subfertile group: a 2.43-fold decrease for *IZUMO1*, a 2.78-fold decrease for *PLCζ*, and a 3.45-fold decrease for *CatSper*, establishing a distinct hierarchy of transcript instability ($P<0.001$). The study demonstrates that cryopreservation induces high transcript degradation that directly compromises flagellar hyperactivation, gamete fusion, and post-fertilization oocyte activation pathways. These findings suggest that integrating quantitative gene expression analysis with conventional spermograms offers an invaluable diagnostic modality to diagnose cryptic male subfertility, optimize semen straw selection, and enhance reproductive efficiency in assisted breeding programs.

Keywords: Bull semen cryopreservation, Gene expression, *CatSper*, *IZUMO1*, *PLCζ*, RT-qPCR.

Молекулярні основи варіації фертильності у кріоконсервованій спермі бугаїв: функціональна оцінка та аналіз експресії генів *IZUMO1*, *PLCζ* та *CatSper*

А. К. Абдулла | О. Х. Харран

Факультет біотехнології,
Університет Аль-Кадісія,
Ель-Діванія, 58001,
провінція Аль-Кадісія,
Ірак

Кріоконсервація сперми є ключовим біотехнологічним інструментом, який застосовують у програмах штучного осіменіння для покращення генетичних ознак великої рогатої худоби. Проте цикл заморожування-розморожування може суттєво знижувати ефективність запліднення через сублетальні клітинні, функціональні та молекулярні пошкодження. Метою цього дослідження було оцінити вплив кріоконсервації на традиційні параметри спермограми та відносний вміст транскриптів, пов'язаних із фертильністю генів-мішеней (*CatSper*, *IZUMO1* та *PLCζ*) у паєтах із замороженою спермою бугаїв-плідників із високою та низькою фертильністю. У межах ретроспективного дослідження було проаналізовано 92 зразки розмороженої сперми (50 від високофертильних і 42 від низькофертильних тварин). Кінетичні характеристики рухливості сперматозоїдів визначали за допомогою комп'ютерного аналізу CASA, тоді як структурну життєздатність, цілісність плазматичної мембрани та нормальну цитоморфологію оцінювали відповідно методом виключення еозину-нігрозину, гіпоосмотичним тестом (HOST) та фарбуванням Diff-Quik. Для визначення відносної експресії генів, нормованої за референсним геном *GAPDH*, виконували кількісну ПЛР у реальному часі (RT-qPCR) за порівняльним математичним методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Аналіз спермограми продемонстрував статистично значуще зниження спрямованої прогресивної рухливості (62,7 проти 65,4 %; $P=0,011$), структурної життєздатності (78,5 проти 80,2 %; $P=0,045$) та функціональної цілісності мембран (72,2 проти 74,6 %; $P=0,045$) у групі з низькою фертильністю, що супроводжувалося пригніченням показника нормальної морфології сперматозоїдів (73,7 проти 78,1 %; $P=0,0001$). Навпаки, загальна рухливість сперматозоїдів не виявила значущої статистичної різниці між вибірками (74,0 проти 77,9 %; $P=0,063$). На молекулярному рівні всі три досліджувані транскрипти продемонстрували глибоке пригнічення в субфертильній групі: зниження експресії *IZUMO1* у 2,43 раза, *PLCζ* у 2,78 раза та *CatSper* у 3,45 раза, що підтвердило чітку ієрархію нестабільності кількості транскриптів ($P<0.001$). Дослідження доводить, що кріоконсервація зумовлює виражену деградацію мРНК, яка безпосередньо порушує процеси гіперактивації джгутика, злиття гамет та активації ооцита в процесі запліднення. Отримані результати свідчать, що інтеграція кількісного аналізу експресії генів з метою оцінки якості сперми забезпечує високу точність діагностики прихованої субфертильності плідників, оптимізує добір паєт з спермою і підвищує ефективність програм штучного осіменіння.

Ключові слова: кріоконсервація сперми бугаїв, експресія генів, *CatSper*, *IZUMO1*, *PLCζ*, RT-qPCR.

Бібліографічний опис для цитування: Абдулла А. К., Харран О. Х. Молекулярні основи варіабельності фертильності кріоконсервованої сперми бугаїв: функціональна оцінка та аналіз експресії генів *IZUMO1*, *PLCζ* та *CatSper*. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 183–192.



Introduction

Artificial insemination techniques serve as a cornerstone for improving livestock production and are widely implemented in breeding programs to enhance genetic traits and boost productivity, as this approach provides an effective method for the long-term preservation of genetic material, while facilitating its transfer and utilization in genetic improvement programs [1].

However, numerous studies have demonstrated a significant decrease in fertility rates when utilizing cryopreserved semen compared to fresh samples, even in cases where spermatozoa exhibit normal motility and morphology. These outcomes strongly indicate the involvement of underlying molecular factors that evade detection by traditional assays. Because routine laboratory tests are limited to evaluating baseline parameters such as sperm motility, morphology, concentration, and viability, they remain insufficient for the accurate prediction of actual fertilization efficiency [2].

In this context, recent studies have focused on molecular markers related to the fertilization process, given that sperm functionality depends on the proper expression of several genes regulating different stages of the fertilization cascade. Among the most critical of these markers are *IZUMO1*, which mediates sperm-egg fusion; *PLCζ*, responsible for post-fertilization oocyte activation; and the *CatSper* gene, which regulates the influx of calcium ions into the spermatozoon – a process essential for inducing the hyperactivation necessary to penetrate the outer layers of the oocyte and successfully complete fertilization [3].

The freezing and thawing process induces severe structural and functional alterations in spermatozoa, including the disruption of plasma membrane integrity, elevated oxidative stress, and impaired mitochondrial function. These changes can detrimentally affect messenger RNA (mRNA) stability and the relative expression of genes involved in fertilization, thereby compromising the sperm's capacity to interact with the oocyte. However, these cryopreservation-induced molecular shifts remain insufficiently explored, particularly in bovines [4].

Recent investigations have demonstrated that cryopreservation workflows lead to a significant downregulation in the gene expression of several proteins associated with the sperm membrane, particularly those orchestrating sperm-egg interactions. For example, transcript levels of mRNA for the *IZUMO1* gene were significantly lower in cryopreserved semen compared to fresh samples, resulting in an impaired capacity of the spermatozoa to bind to and fuse with the oolemma [5].

Similarly, a significant downregulation in the expression of the *PLCζ* gene, the pivotal factor responsible for stimulating calcium waves within the oocyte post-fertilization, has been observed. This molecular deficiency leads to oocyte activation failure and the subsequent disruption of early embryonic cleavages [6].

Despite significant progress in understanding the impact of cryopreservation on semen quality, most studies

have focused on conventional parameters or examined each gene individually. Investigations that simultaneously link the relative gene expression of *IZUMO1*, *PLCζ*, and *CatSper* to the actual fertilization efficiency of cryopreserved bovine semen remain limited.

The aim of the study

The aim of this study was to compare the relative gene expression of *CatSper*, *IZUMO1*, and *PLCζ* genes in the cryopreserved semen of high-fertility and low-fertility bulls to assess their potential as molecular biomarkers that enhance the accuracy of fertilization efficiency predictions and improve the outcomes of artificial insemination programs.

Problem statement. Artificial insemination (AI) centers and in vitro fertilization (IVF) laboratories routinely rely on traditional assays to assess the quality of cryopreserved semen. However, the outcomes of these baseline tests do not always correlate with actual field fertility rates in cows. Certain samples may exhibit acceptable motility, viability, and normal morphology, yet yield low fertilization rates, strongly suggesting the presence of underlying molecular or functional deficits that evade detection by routine screenings.

Research hypothesis. This study hypothesizes that low fertility in cryopreserved bovine semen is closely associated with a reduced relative expression of the *CatSper*, *IZUMO1*, and *PLCζ* genes, and that analyzing their transcript abundance provides a more precise and reliable assessment of fertilization efficiency compared to conventional semen testing.

Study objectives:

1. To evaluate the quality of cryopreserved bull semen using conventional laboratory assays.
2. To measure the transcript expression levels of the *CatSper*, *IZUMO1*, and *PLCζ* genes using quantitative RT-qPCR.
3. To compare relative gene expression profiles between high-fertility and low-fertility semen samples.
4. To evaluate the potential of using these specific genes as functional molecular indicators to forecast fertilization efficiency.

Materials and methods

Study area, design, and sample classification

A retrospective review of the reproductive records at the artificial insemination center in Diwaniyah Governorate, Iraq, revealed a notable discrepancy in field pregnancy rates. This variation occurred despite the fact that all utilized semen straws strictly met established quality standards during routine testing both pre-freezing and post-thawing. Furthermore, no technical anomalies were recorded regarding storage conditions or liquid nitrogen levels.

In this study, cryopreserved semen straws served as the primary unit for molecular analysis, whereas field pregnancy outcomes were utilized to stratify the samples into high-fertility and low-fertility groups, accounting for

the bull effect in the subsequent statistical modeling. The semen straws were classified into two distinct cohorts based on the documented reproductive outcomes of the inseminated cows:

- High-Fertility Group (n = 50 semen samples): Semen samples where pregnancy was successfully confirmed via manual rectal palpation at 45 and 60 days following the initial insemination.

- Low-Fertility Group (n = 42 semen samples): Semen samples from cows that failed to conceive after at least three consecutive inseminations, despite identical storage, handling, and thawing conditions across both cohorts.

All samples were coded and classified based on post-thaw fertility indicators. Standard semen analysis – including the baseline evaluation of motility and morphology – showed statistical similarity between the two groups within acceptable thresholds, highlighting the critical limitations of conventional criteria in elucidating variations in fertilization efficiency. Notably, a subset of cows that had previously failed to conceive successfully achieved pregnancy when re-inseminated with semen from the high-fertility cohort, strongly suggesting the involvement of cryptic molecular or functional factors that evade routine laboratory screening.

To ensure high reproducibility, a standardized operating protocol was strictly implemented across all stages of the study, including sample thawing, conventional laboratory assays, and quantitative gene expression analysis via RT-qPCR. All procedural steps were performed identically, ensuring that any observed differences between the samples resulted strictly from biological variations rather than procedural discrepancies.

Cow selection and exclusion criteria

To minimize the confounding effects of female reproductive factors on the field pregnancy outcomes, all cows included in the retrospective cohort underwent a comprehensive pre-insemination reproductive screening. The specific parameters for animal enrollment were established based on the following selection criteria:

Inclusion criteria: Local, multiparous cows aged between 3 and 7 years; Body condition score (BCS) between 2.5 and 3.5 at the time of insemination; Regular estrous cycles confirmed by two consecutive progesterone measurements or direct behavioral observation; Transrectal palpation demonstrating a dominant follicle with a minimum diameter of 12 mm at the time of insemination, accompanied by a normal uterine wall tone and the complete absence of ovarian cysts or a persistent corpus luteum; No clinical history of reproductive pathology, such as metritis or pyometra, within the preceding 90 days.

Exclusion criteria: Cows presenting with endometritis; Cows with abnormal peripheral progesterone profiles indicative of ovulatory disturbances or luteal phase insufficiency; Cows that had received any hormonal therapy within 30 days prior to artificial insemination; Cows with a body condition score (BCS) below 2.0 or exceeding 4.0.

Based on the strict fulfillment of all inclusion criteria, the enrolled cows were considered reproductively sound. Consequently, any failure to conceive within the low-fertility cohort was primarily attributed to sperm-related

factors, thereby validating the classification of semen straws as the primary independent variable in this study.

Thawing and sample preparation

Cryopreserved semen straws were retrieved from liquid nitrogen storage (-196°C) and thawed in a digital water bath at 37°C for 30–40 seconds. After being thoroughly dried, the straws were opened under aseptic conditions, and their contents were transferred into a sterile 15-mL conical centrifuge tube. The samples were subsequently incubated at 37°C for 10 minutes prior to downstream analysis. The individual straw identification number, assigned fertility cohort, and exact thawing date were recorded for each sample.

Laboratory tests

The operational protocols for assessing baseline sperm quality parameters were adapted from the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen [7], with minor modifications to accommodate the specific requirements for evaluating cryopreserved bovine spermatozoa. To ensure strict methodological alignment with veterinary medicine standards, the guidelines of the Society for Theriogenology [8], which are widely implemented in assessing the fertility potential of farm animals, were also integrated into the experimental workflow.

Sperm evaluation using CASA

Sperm motility characteristics were evaluated using a Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) system as the primary quantitative methodology. A 5–10 μL aliquoted semen sample was loaded onto a pre-heated microscope slide maintained at 37°C , and a minimum of 200 spermatozoa were tracked and analyzed per individual sample. The assessed kinematic parameters included total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), straight-line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearity (LIN, %), amplitude of lateral head displacement (ALH, μm), and beat cross-frequency (BCF, Hz) [9].

Sperm morphology assessment

For morphological evaluation, a total of 200 spermatozoa per sample were stained using the Diff-Quik methodology and examined under a light microscope at $1000\times$ magnification using an oil immersion lens. Structural abnormalities localized in the sperm head, midpiece, and tail were recorded according to standardized veterinary and theriogenology criteria for bovine semen, with the results expressed as percentages [10].

Gene expression analysis by RT-qPCR

Quantitative gene expression analysis was performed according to the methodology described by [11], with minor modifications.

Total RNA extraction

Total RNA from the thawed spermatozoa was isolated using the GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA) in strict accordance with the manufacturer's operational instructions. On-column

DNase I digestion was implemented to eliminate any residual genomic DNA contamination. Total RNA concentration and purity were assessed using a NanoDrop Spectrophotometer based on the 260/280 nm absorbance ratio, with values ranging strictly between 1.8 and 2.0 considered acceptable for downstream applications. Additionally, RNA structural integrity was verified via horizontal gel electrophoresis on a 1 % agarose gel supplemented with SafeRed dye, run at 90 V for 20 minutes.

cDNA synthesis

For reverse transcription, 1 µg of isolated total RNA was converted into complementary DNA (cDNA) using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) in strict accordance with the manufacturer's operational manual. The amplification protocol involved the initial denaturation of

RNA secondary structures at 65 °C for 5 minutes, followed by the reverse transcription reaction at 42 °C for 60 minutes. The process was finalized by enzyme thermal inactivation at 70 °C for 5 minutes. The resulting cDNA templates were stored at –20 °C until further utilization in downstream quantitative RT-qPCR assays.

Primer Design. Specific oligonucleotide primer sequences for the target genes (*IZUMO1*, *PLCζ*, and *CatSper*) and the internal reference gene (*GAPDH*) were designed based on the GenBank database (NCBI) using Primer3 software. Primer specificity, thermodynamic characteristics, and the prevention of self- or cross-dimer formations were thoroughly verified utilizing the PCR PrimerStats software application. The optimized primer sequences, target gene configurations, and specific melting temperatures are summarized in [Table 1](#).

Table 1
Characteristics and oligonucleotide sequences of the primers used for RT-qPCR

Target gene	Primer sequence (5'–3')	NCBI Gene ID	Amplicon size (bp)	T _m (°C)
<i>IZUMO1</i>	F: 5'-TTCCAGAACTCAGGGAAGG-3' R: 5'-CATTTCAGCTTCCGGTCTTC-3'	618057	134	59.8
<i>PLCζ</i>	F: 5'-AGGCTGAAGTTGGGGATTTC-3' R: 5'-ACCTTCAGCCAACAACATCC-3'	514590	123	60.0
<i>CatSper</i>	F: 5'-GTCCATTGTGTTGGTGATGC-3' R: 5'-ATACTTTGGCCACCTGATGC-3'	616691	130	59.8
<i>GAPDH</i>	F: 5'-CTCCCTCTTTTCCAGCAATG-3' R: 5'-TTCAAGTTCCCACTCC-3'	281181	120	59.9

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Transcript expression analysis was executed via quantitative real-time PCR utilizing an Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Blocker (Bioneer, Korea) and Maxima SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific, USA). The reaction mixture was prepared to a final volume of 20 µL, comprising 10 µL of SYBR Green Master Mix (2×), 1 µL of each forward and reverse primer (10 pmol/µL), 2 µL of cDNA template, and supplemented to volume with nuclease-free water.

The RT-qPCR amplification was performed using a optimized thermal profile consisting of an initial denaturation stage at 95 °C for 3 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 seconds, primer annealing at 60 °C for 30 seconds, and extension at 72 °C for 30 seconds. To verify the thermodynamic specificity of the amplification products, a post-amplification melting curve analysis was executed within a temperature range of 65–95 °C, with a continuous heating ramp of 0.5 °C every 5 seconds. All reactions were performed in triplicate per biological sample to ensure high analytical reproducibility. Each operational run included a no-template negative control (NTC) to monitor for potential contamination, alongside a positive control utilizing cDNA derived from healthy bovine testicular tissue to validate amplification efficiency.

The cycle threshold (*Ct*) values were automatically determined by the Exicycler™ 96 system software. To control for variations arising from differences in initial RNA quantity or reverse transcription efficiency across individual samples, target gene expression levels were normalized against the internal reference gene (*GAPDH*).

The relative fold change in transcript abundance was calculated using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak methodology) [12]:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

The high-fertility sample cohort served as the experimental calibrator, with its baseline relative gene expression level standardized to 1.00. The final quantitative outcomes were expressed as mean ± standard deviation (Mean±SD) calculated from three independent replicates for each sample to minimize experimental variance ([Fig. 1](#)).

The flowchart illustrates the sequential methodology, starting with the classification of cryopreserved semen straws based on field fertility levels. This is followed by the evaluation of conventional sperm parameters, total RNA extraction, and the relative gene expression analysis of *CatSper*, *IZUMO1*, and *PLCζ* transcripts via RT-qPCR. The process concludes with the comprehensive statistical analysis of the quantitative results.

Statistical analysis

All statistical evaluations were performed using IBM SPSS Statistics software, version 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Quantitative data are expressed as mean ± standard deviation (Mean ± SD). The normality of the data distribution was verified using the Shapiro-Wilk test. To determine significance between the high-fertility cohort and the low-fertility (cryopreserved semen) group, an independent-samples Student's t-test was implemented.

The relative gene expression profiles of the *IZUMO1*, *PLCζ*, and *CatSper* genes were calculated using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak methodology), with the high-fertility group serving as the experimental calibrator (standardized to 1.00) to determine the relative fold

change in transcript abundance. A probability value of $P < 0.05$ was adopted as the threshold for statistical significance, whereas $P < 0.001$ was considered highly statistically significant [13].

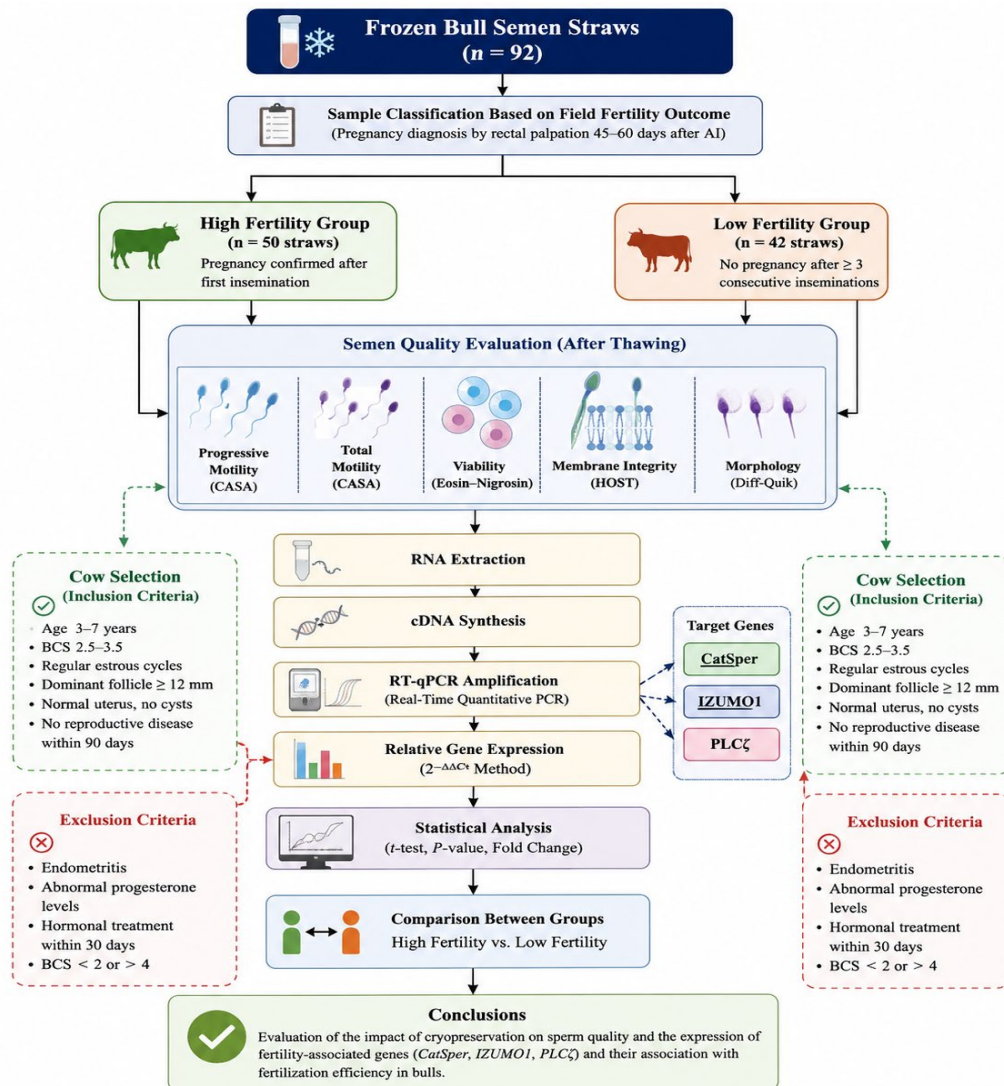


Fig. 1. Schematic workflow of the experimental study design

Results and discussion

Conventional semen profile

To establish a baseline functional baseline, a comparative evaluation of conventional semen

characteristics was executed between the high-fertility and low-fertility cohorts. The quantitative parameters, including sperm motility kinetics, structural viability, membrane permselectivity, and cytomorphological profiles, are summarized in **Table 2**.

Table 2

Comparative analysis of conventional semen parameters and sub-cellular structural integrity between high- and low-fertility cryopreserved bull straws, Mean $\pm$ SD

Sperm quality parameter	High-fertility group (n = 50)	Low-fertility group (n = 42)	Relative reduction (%)	P-value
Progressive motility (PR, %)	65.4 $\pm$ 5.2	62.7 $\pm$ 4.8	4.13	0.011
Non-progressive motility (NP, %)	12.5 $\pm$ 2.1	11.3 $\pm$ 3.0	9.60	0.031
Total motility (%)	77.9 $\pm$ 4.5	74.0 $\pm$ 5.1	5.20	0.063
Sperm viability (Eosin-nigrosin, %)	80.2 $\pm$ 3.7	78.5 $\pm$ 4.2	2.12	0.045
Membrane integrity (HOST, %)	74.6 $\pm$ 5.0	72.2 $\pm$ 6.1	3.22	0.045
Normal sperm morphology (Diff-Quik, %)	78.1 $\pm$ 4.8	73.7 $\pm$ 5.5	5.63	0.0001

Notes: An independent-samples Student's t-test was utilized for statistical comparisons between the experimental cohorts. Statistical significance was defined at $P < 0.05$, whereas highly statistically significant differences were defined at $P < 0.001$.

Quantitative assessment of semen parameters

The spermogram outcomes revealed that cryopreservation workflows induced a significant degradation of directional kinetic traits in the low-fertility cohort. Specifically, a statistically significant decrease was observed in progressive sperm motility within the low-fertility group compared to the high-fertility control ($62.7 \pm 4.8\%$ vs. $65.4 \pm 5.2\%$, respectively; $P=0.011$), accompanied by a significant reduction in non-progressive motility ($P=0.031$). Conversely, the variance in overall total sperm motility between the two experimental cohorts did not reach the threshold for statistical significance ($74.0 \pm 5.1\%$ vs. $77.9 \pm 4.5\%$; $P=0.063$).

Furthermore, sub-cellular structural traits were compromised in the low-fertility group; both structural sperm viability, assessed via Eosin-Nigrosin exclusion, and functional plasma membrane integrity, determined through the hypoosmotic swelling test (HOST), exhibited significant reductions ($P=0.045$ for both parameters).

Table 3. Comparative assessment of relative transcript abundance and fold changes for fertility-associated genes between high- and low-fertility bull semen cohorts

Target gene	High-fertility calibrator group (Mean $\pm$ SD)	Low-fertility / cryopreserved group (Mean $\pm$ SD)	Fold change analysis	P-value
<i>IZUMO1</i>	1.00 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.09	↓ 2.43	<0.001
<i>PLCζ</i>	1.00 $\pm$ 0.06	0.36 $\pm$ 0.07	↓ 2.78	<0.001
<i>CatSper</i>	1.00 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.06	↓ 3.45	<0.001

Notes: The high-fertility cohort served as the experimental calibrator, with its baseline relative gene expression level normalized to 1.00. Relative transcript expression levels were calculated using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ methodology (Livak method). Downward arrows (↓) indicate significant transcript downregulation relative to the calibrator group.

Quantitative assessment of relative gene expression

The molecular outcomes demonstrated a profound and highly significant suppression of mRNA transcript stability across all investigated target loci in the low-fertility group compared to the high-fertility control (Table 3, Figs. 2, 3).

Regarding the *IZUMO1* locus, the mean relative gene expression dropped to 0.41 ± 0.09 within the low-fertility cohort relative to the baseline calibrator value (1.00 ± 0.08), representing a highly statistically significant 2.43-fold downregulation ($P<0.001$). Similarly, the transcript level for the *PLCζ* gene was significantly reduced to 0.36 ± 0.07 in subfertile samples compared to the control group (1.00 ± 0.06), yielding a highly significant 2.78-fold decrease ($P<0.001$).

The *CatSper* gene exhibited the most severe suppression among all analyzed molecular markers. Its mean relative expression level dropped to 0.29 ± 0.06 in the low-fertility group compared to 1.00 ± 0.05 in the high-fertility control cohort. This reduction represents a highly statistically significant 3.45-fold downregulation ($P<0.001$).

Taken together, these results indicate a coordinated downregulation of fertility-associated transcripts in cryopreserved semen straws from subfertile bulls, with the magnitude of suppression establishing a distinct hierarchy: *CatSper* > *PLCζ* > *IZUMO1*. This consistent transcript degradation implies a direct functional link between compromised mRNA stability and reduced fertilization efficiency, given the critical physiological roles these specific genes play in modulating sperm

Additionally, the incidence of normal sperm morphology was significantly suppressed in the low-fertility group ($73.7 \pm 5.5\%$ vs. $78.1 \pm 4.8\%$; $P=0.0001$), reflecting a highly significant increase in overall structural abnormalities. Taken together, these data indicate that while baseline total motility remained statistically equivalent, the specific functional and structural attributes of the spermatozoa were heavily impaired in the low-fertility cohort.

Relative transcript expression profile

To elucidate the molecular mechanisms underlying the observed variations in field fertility, a quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis was executed for three critical fertility-associated target genes. The relative transcript abundance levels of *IZUMO1*, *PLCζ*, and *CatSper* were normalized against the internal reference gene (*GAPDH*), and the comparative data across the high-fertility and low-fertility cohorts are summarized in Table 3.

hyperactivation, post-fertilization oocyte activation, and gamete membrane fusion pathways.

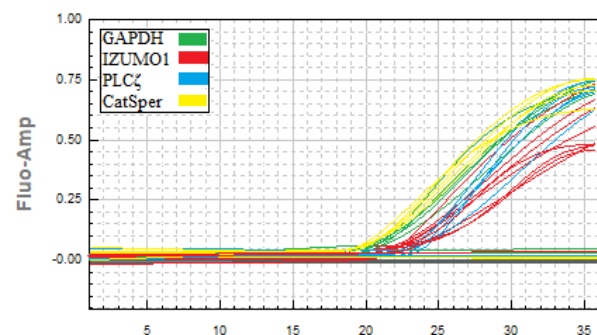


Fig. 2. Real-time PCR amplification curves of the target genes in the high-fertility group

The representative plots demonstrate the fluorescence intensity shifts across 36 amplification cycles. Variation in the amplification onset cycles reflects distinct quantification baseline thresholds (C_t values). The *CatSper* gene recorded the lowest Mean C_t value (20.75), indicating high transcript abundance, followed sequentially by *IZUMO1* (23.04) and *PLCζ* (24.24), which exhibited relatively delayed amplification curves indicative of lower relative expression levels.

The representative plots demonstrate a general delay in the amplification onset cycle for all investigated transcripts compared to the control cohort, corresponding to higher mean C_t values. Specifically, the *IZUMO1*

locus recorded a mean Ct value of 24.33, and *CatSper* recorded a mean Ct value of 25.04, whereas *PLCζ* exhibited the highest threshold detection value (25.74). The overall rightward shift of the amplification trajectories indicates that a higher number of replication cycles was required to detect target fluorescence signals, confirming a severe suppression of mRNA stability, with the most pronounced downregulation observed in the *CatSper* gene.

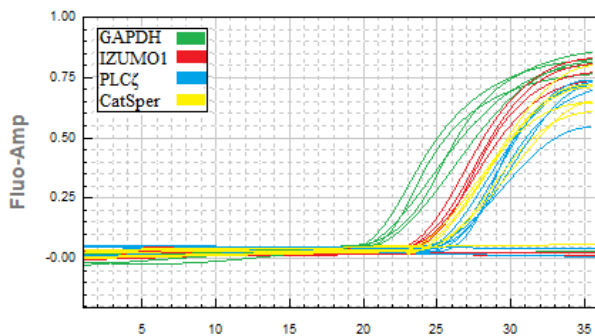


Fig. 3. Real-time PCR amplification curves of the target genes in the low-fertility group

The findings presented in *Table 2* indicate limited discrepancies in certain conventional semen parameters, contrasting sharply with the pronounced downregulation observed in fertility-associated gene expression. This is consistent with previous reports highlighting that relying solely on routine semen indicators is insufficient for a comprehensive assessment of fertilization efficiency, and that integrating molecular markers provides a more accurate evaluation of bull fertility [14].

Our results demonstrate a significant decrease in progressive sperm motility within the low-fertility group compared to the high-fertility cohort (62.7 % vs. 65.4 %, respectively; $P=0.011$). This decline likely reflects an impaired capacity of spermatozoa to efficiently reach the site of fertilization, given that progressive motility strictly depends on mitochondrial integrity, energy production efficiency, and the maintenance of intracellular ionic balance [15]. Such downregulation can be attributed to cryopreservation-induced cellular damage, which suppresses ATP production and accelerates reactive oxygen species (ROS) formation, ultimately disrupting directional sperm movement [16].

Notably, while no statistically significant difference was observed in total sperm motility between the two cohorts ($P=0.063$), progressive motility was significantly compromised in the low-fertility group ($P=0.011$). This underscores that progressive motility is more intimately linked to fertilization success, as it dictates the sperm's capacity to navigate toward and penetrate the oocyte. Consequently, evaluating total motility alone proves to be an inadequate standalone metric for predicting the fertilization potential of cryopreserved semen straws [17].

Our results also demonstrate a significant reduction in both sperm viability and plasma membrane integrity within the low-fertility group compared to the high-fertility cohort ($P=0.045$ for both parameters).

This decline is primarily attributable to cryopreservation-induced injuries, including osmotic shock, intracellular ice crystal formation, and oxidative stress, which collectively compromise membrane permselectivity and disrupt transmembrane ion transport mechanisms. Such structural alterations detrimental to sperm metabolic activity, survival, and capacitation pathways have been extensively documented [18]. Furthermore, the proportion of morphological abnormalities was markedly elevated in the low-fertility group, showing a highly significant difference ($P=0.0001$). This structural deterioration suggests that freezing-thawing cycles cause severe physical damage to sperm sub-cellular components, thereby impairing sperm-egg interactions and paternal genetic material transfer, ultimately leading to reduced fertilization efficiency [19].

In summary, while most conventional semen characteristics were inferior in the low-fertility group, the magnitude of these reductions remained relatively narrow, and the variance in total motility lacked statistical significance ($P = 0.063$). These modest discrepancies reinforce the premise that routine semen profiles fail to comprehensively capture the cellular and molecular deficits governing fertilization success. Consequently, these findings validate the clinical necessity of supplementing traditional assays with functional molecular biomarkers to ensure precise fertility forecasting in artificial insemination programs utilizing cryopreserved semen straws [20].

The analysis of transcript abundance revealed that the *IZUMO1* gene was markedly downregulated in the low-fertility group compared to the high-fertility control cohort, exhibiting a highly statistically significant 2.43-fold decrease ($P<0.001$) (*Table 3*, *Figs. 2, 3*). This prominent transcript degradation aligns with the molecular patterns observed by previous investigators, who demonstrated that *IZUMO1* protein abundance – measured via Western blot and immunohistochemical staining – strongly correlates with field fertility rates and reproductive outcomes [21]. Consequently, the marked suppression of *IZUMO1* transcripts identified in our low-fertility cohort directly points to a compromised capacity of the spermatozoa to bind to and fuse with the oolemma, thus explaining the reduction in actual fertilization efficiency.

As an indispensable transmembrane component localized on the sperm head, the *IZUMO1* protein plays a mandatory role in mediating gamete membrane fusion. Our findings align with the data reported by [22], who observed that suppressed *IZUMO1* levels strongly correlate with reduced reproductive outcomes, suggesting that quantification of this marker serves as a robust diagnostic tool for evaluating male fertility potential. Furthermore, recent structural investigations underscore the collaborative nature of the sperm-egg interaction cascade, emphasizing that while *IZUMO1* is a critical executioner of fusion, the process dynamically requires the synergistic participation of other membrane-bound molecules [23]. The pronounced transcript degradation identified in our subfertile sample cohort may be fundamentally linked to cryopreservation-induced oxidative stress. Extensive reviews confirm that elevated

reactive oxygen species (ROS) trigger rapid mRNA instability and oxidative damage to crucial paternal surface proteins, whereas mitigating these oxidative stressors represents a primary pathway for optimizing reproductive efficiency [24].

The *PLC ζ* gene exhibited a distinct 2.78-fold downregulation in the low-fertility group compared to the high-fertility cohort ($P < 0.001$) (**Table 3**). Phospholipase C zeta (*PLC ζ*) serves as the critical sperm-borne oocyte activation factor (SOAF) responsible for triggering intracellular calcium (Ca^{2+}) oscillations post-fusion – a biochemical prerequisite for meiotic resumption, cortical granule exocytosis, and the initiation of early embryonic development. Functional validation trials have confirmed that *PLC ζ* absolute deficiencies, structural mutations, or transcription blocks are heavily implicated in male-factor subfertility and total fertilization failure due to failed oocyte activation [6]. Consequently, the significant suppression of *PLC ζ* expression demonstrated in the current study provides a robust molecular explanation for the compromised fertilization outcomes observed in the low-fertility group.

The simultaneous downregulation in the gene expression of both *IZUMO1* and *PLC ζ* highlights coordinated alterations in transcripts governing distinct, sequential stages of the fertilization cascade. Regarding *PLC ζ* , loss-of-function investigations have demonstrated that spermatozoa deficient in this specific phospholipase fail to trigger essential intracellular Ca^{2+} oscillations post-fusion, resulting in severe subfertility or complete developmental arrest [25]. Thus, the concurrent suppression of *IZUMO1* and *PLC ζ* transcripts observed in our current study provides a compelling molecular rationale for the reduced fertilization outcomes, even in instances where baseline spermogram characteristics remained within clinically acceptable thresholds. These outcomes strongly suggest that field fertility potential is not merely dictated by cellular traits visible under light microscopy, but is fundamentally influenced by the structural and functional integrity of downstream molecular mechanisms.

Consequently, the quantification of *IZUMO1* and *PLC ζ* mRNA levels emerges as a promising diagnostic modality for assessing cryopreserved semen quality, revealing critical sub-cellular anomalies that evade detection by conventional laboratory screenings. Furthermore, integrating these functional molecular markers into routine breeding evaluations could significantly enhance the precision of semen straw selection and optimize the overall efficiency of artificial insemination and assisted reproductive workflows [26].

The *CatSper* gene exhibited the most pronounced suppression of transcript abundance among all investigated target loci within the low-fertility cohort, dropping 3.45-fold compared to the high-fertility control ($P < 0.001$) (**Table 3**). *CatSper* functions as a principal, sperm-specific multi-subunit cation channel essential for regulating transmembrane influxes of calcium ions, a process tightly linked to the modulation of flagellar beat asymmetry and sperm motility profiles. Structural or functional disruptions within this ion channel complex have been thoroughly associated with idiopathic male

infertility [27]. Our findings align with previous investigations highlighting the indispensable role of *CatSper* channels during fertilization and its potential utility as a high-resolution molecular marker for uncovering hidden subfertility, an area of reproductive biology that remains insufficiently explored in bovines [3]. Therefore, the critical loss of *CatSper* transcripts identified in the low-fertility group directly points to an impaired capacity for flagellar hyperactivation, reinforcing the clinical necessity of supplementing routine motility assays with precise molecular transcript profiling.

This sharp reduction in *CatSper* gene expression can be further elucidated by sub-cellular damage inherent to the cryopreservation cycle. Sperm freezing-thawing cycles induce severe molecular changes that compromise post-thaw semen functionality. Recent high-throughput proteomic and transcriptomic profiles have confirmed widespread freeze-related alterations in structural proteins and critical signaling molecules that dynamically regulate sperm function. These cryo-injuries directly influence the spermatozoa's capacity to withstand thermal shock and maintain normal functional traits [21]. Consequently, the observed 3.45-fold downregulation of *CatSper* transcripts ($P < 0.001$) serves as a critical molecular hallmark of sublethal cryo-injury within the low-fertility cohort.

The simultaneous downregulation of *CatSper*, *IZUMO1*, and *PLC ζ* transcripts reflects a comprehensive cascade failure across key sequential stages of fertilization – spanning from flagellar hyperactivation and gamete membrane fusion to oocyte activation [3, 6]. These cumulative findings firmly corroborate that relying solely on conventional spermogram profiles is insufficient for a comprehensive prediction of actual field fertilization outcomes. Integrating quantitative gene expression analysis into routine workflows offers a high-resolution diagnostic tool to optimize semen straw selection and enhance the overall reproductive efficiency of artificial insemination and assisted reproduction programs [2, 4]. Ultimately, these results provide a foundational molecular baseline for developing advanced, targeted cryopreservation protocols designed to preserve transcript stability and protect fertility-associated target genes.

Conclusions

The present study established that while cryopreserved bovine spermatozoa from the low-fertility cohort exhibited minor reductions in conventional semen quality parameters, the most profound and critical alterations occurred at the molecular level. Freezing-thawing workflows induced a highly significant downregulation in the transcript levels of all investigated fertility-associated target genes ($P < 0.001$). The magnitude of this suppression followed a distinct hierarchical order, with the largest decrease identified in *CatSper* expression (3.45-fold), followed sequentially by *PLC ζ* (2.78-fold) and *IZUMO1* (2.43-fold).

These cumulative findings reinforce that routine spermograms fail to comprehensively mirror actual field fertilization potential. Supplementing traditional laboratory assays with quantitative gene expression

profiling provides a high-resolution diagnostic approach to precisely evaluate cryopreserved semen quality. Ultimately, *CatSper*, *PLCζ*, and *IZUMO1* are determined to be highly promising functional molecular biomarkers capable of identifying cryptic male subfertility and optimizing semen straw selection for cattle breeding and assisted reproduction programs.

DECLARATIONS

Ethical Statement

The authors declare that this study was conducted in strict accordance with national and institutional ethical guidelines governing the handling and utilization of biological materials of animal origin. The experimental procedures were performed exclusively on commercially available cryopreserved bull semen straws; therefore, no direct interventions, manipulations, or experimental protocols were executed on live animals, and obtaining formal institutional bioethics committee approval was not required for this research.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors express their sincere gratitude and appreciation to the Artificial Insemination Center in Diwaniyah Governorate, Iraq, for providing the cryopreserved semen straws used in this study. Special thanks are also extended to the Faculty of Biotechnology at Al-Qadisiyah University, its administrative and technical staff, and all individuals who contributed to the successful execution of the laboratory experiments and the completion of this research.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The authors declare that ChatGPT (OpenAI) was utilized solely to assist with linguistic editing, structural formatting, and the refinement of specific manuscript paragraphs, as well as to assist in designing the conceptual layout of the experimental flowchart. Artificial intelligence technologies were strictly not employed for the generation, rendering, or formatting of scientific data plots, nor for any statistical analyses or interpretation of the biological results. The authors maintain full accountability for the integrity of the content, data accuracy, and final conclusions presented in this study.

References

1. Nebel, R. L., & Jobst, S. M. (1998). Evaluation of systematic breeding programs for lactating dairy cows: A review. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 1169–1174. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(98\)75679-6](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(98)75679-6)
2. Xie, Q., Jiang, X., Zhao, M., Xie, Y., Fan, Y., Suo, L., Kuang, Y. & (2024_). Effect of freezing and thawing on ejaculated sperm and subsequent pregnancy and neonatal outcomes in IVF. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1408662. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1408662>
3. Vicente-Carrillo, A., Álvarez-Rodríguez, M., & Rodríguez-Martínez, H. (2023). The cation/calcium channel of sperm (*CatSper*): A common role played despite inter-species variation? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13750. <https://doi.org/10.3390/ijms241813750>
4. Castro, M., Leal, K., Pezo, F., & Contreras, M. J. (2025). Sperm membrane: Molecular implications and strategies for cryopreservation in productive species. *Animals*, 15(12), 1808. <https://doi.org/10.3390/ani15121808>
5. Miller, C. M., Duong, S., Weaver, A. L., Zhao, Y., & Shenoy, C. C. (2021). Outcomes of frozen oocyte donor in vitro fertilization (IVF) cycles using fresh versus frozen sperm. *Reproductive Sciences*, 29(4), 1226–1231. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00796-9>
6. Saleh, A., Kashir, J., Thanassoulas, A., Safieh-Garabedian, B., Lai, F. A., & Nomikos, M. (2020). Essential role of sperm-specific PLC-zeta in egg activation and male factor infertility: An update. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 28. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00028>
7. World Health Organization. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (6th ed.). World Health Organization.
8. Kennedy, S. P., Spitzer, J. C., Hopkins, F. M., Higdon, H. L., & Bridges, W. C. (2002). Breeding soundness evaluations of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. *Theriogenology*, 58(5), 947–961. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00911-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00911-1)
9. Van der Horst, G., & Maree, L. (2025). Assessment of sperm motility with the use of computer-aided sperm analysis (CASA). In M. Álvarez-Rodríguez (Ed.), *Spermatology* (pp. 219–234). Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4406-5_16
10. Ibrahim, M. A. (2024). Bull sperm cryopreservation: An overview on the current status and future perspectives. *German Journal of Veterinary Research*, 4(1), 9–22. <https://doi.org/10.51585/gjvr.2024.1.0071>
11. Chen, X., Wang, Y., Zhu, H., Hao, H., Zhao, X., Qin, T., & Wang, D. (2015). Comparative transcript profiling of gene expression of fresh and frozen-thawed bull sperm. *Theriogenology*, 83(4), 504–511. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.015>
12. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
13. Field, A. (2018). *Discovering statistics using IBM SPSS statistics* (5th ed.). SAGE Publications.
14. Bollwein, H., & Malama, E. (2023). Review: Evaluation of bull fertility. Functional and molecular approaches. *Animal*, 17, 100795. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100795>
15. Li, Y., Kalo, D., Zeron, Y., & Roth, Z. (2014). Progressive motility – a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. *Zygote*, 24(1), 70–82. <https://doi.org/10.1017/s0967199414000720>
16. Kaltsas, A. (2023). Oxidative stress and male infertility: The Protective role of antioxidants. *Medicina*, 59(10), 1769. <https://doi.org/10.3390/medicina59101769>
17. Vincent, P., Underwood, S. L., Dolbec, C., Bouchard, N., Kroetsch, T., & Blondin, P. (2014). Bovine semen quality control in artificial insemination centers. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine reproduction* (pp. 685–695). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch74>
18. Ozimic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. (2023). Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), 4716–4734. <https://doi.org/10.3390/cimb45060300>
19. Ray, P. F., Toure, A., Metzler-Guillemain, C., Mitchell, M. J., Arnoult, C., & Coutton, C. (2016). Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clinical Genetics*, 91(2), 217–232. <https://doi.org/10.1111/cge.12905>
20. Hendri, H., Ananda, A., Damayanti, E., Sonjaya, H., Rosyada, Z. N. A., Lamid, M., Al Arif, M. A., Lokapimasari, W. P., Hapila, A., Maulana, T., & Iskandar, H. (2026). Integrative functional and molecular characterization of Bali bull semen and its relationship with reproductive performance. *Veterinary World*, 19(4), 1447–1458. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2026.1447-1458>

21. Khan, I. M., Cao, Z., Liu, H., Khan, A., Rahman, S. U., Khan, M. Z., Sathanawongs, A., & Zhang, Y. (2021). Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 609180. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>
22. Khan, M. Z., Chen, W., Naz, S., Liu, X., Liang, H., Chen, Y., Kou, X., Liu, Y., Ashraf, I., Han, Y., Peng, Y., Wang, C., & Zahoor, M. (2024). Determinant genetic markers of semen quality in livestock. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1456305. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1456305>
23. Hernández-Falcó, M., Sáez-Espinosa, P., López-Botella, A., Aizpurua, J., & Gómez-Torres, M. J. (2022). The role of sperm proteins IZUMO1 and TMEM95 in mammalian fertilization: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3929. <https://doi.org/10.3390/ijms23073929>
24. Wang, Y., Fu, X., & Li, H. (2025). Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Frontiers in Endocrinology*, 16, 1520835. <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1520835>
25. Hachem, A., Godwin, J., Ruas, M., Lee, H. C., Ferrer Buitrago, M., Ardestani, G., Bassett, A., Fox, S., Navarrete, F., de Sutter, P., Heindryckx, B., Fissore, R., & Parrington, J. (2017). *PLCζ* is the physiological trigger of the Ca²⁺ oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence. *Development*, 144(16), 2914–2924. <https://doi.org/10.1242/dev.150227>
26. Saito, T., Wada, I., & Inoue, N. (2019). Sperm IZUMO1-dependent gamete fusion influences male fertility in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4809. <https://doi.org/10.3390/ijms20194809>
27. Shanaz, S., Hamadani, A., Firdous, S., Shah, R., Rather, M. A., Khan, N. N., & Ganai, N. A. (2022). CatSper genes and their role in male infertility: A review. *SKUAST Journal of Research*, 24(3), 272–284. <https://doi.org/10.5958/2349-297x.2022.00047.2>

ORCID

A. K. Abdulla 

<https://orcid.org/0000-0001-8315-0116>

Z. A. A. Al-Talabani 

<https://orcid.org/0009-0006-2997-8872>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Comparative study of fresh and cryopreserved rat mesenchymal stem cells: cell viability, immunological gene expression, and cytokine production

G. K. Esmael

Article info

Correspondence Author

G. K. Esmael

E-mail:

ghassan.khudhair@qu.edu.iqCollege of Veterinary
Medicine, University of Al-
Qadisiyah,
Al-Diwaniyah City,
Al-Qadisiyah Governorate,
58002, Iraq

Citation: Esmael, G. K. (2026). Comparative study of fresh and cryopreserved rat mesenchymal stem cells: cell viability, immunological gene expression, and cytokine production. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 193–204. doi: 10.31210/spi2026.29.02.27

Cryopreservation is fundamental for mesenchymal stem cell (MSC) banking, but the freeze–thaw cycle induces sub-cellular stress, potentially modifying the post-thaw genomic and paracrine identity of the cellular product. This study aimed to compare the biological, molecular, and functional stability of fresh and cryopreserved rat bone marrow MSCs (*Rattus norvegicus* BM-MSCs). Rat BM-MSCs were allocated into non-cryopreserved control cells (Fresh-MSCs) and cells frozen for 4 weeks in liquid nitrogen using 10 % DMSO (Cryo-MSCs). Cell survival was determined using the MTT assay. Immunoregulatory (*Il10*, *Tgfb1*, *Ido1*) and apoptotic (*Bax*, *Casp3*, *Bcl2*) transcripts were evaluated via RT-qPCR. Paracrine protein concentrations of IL-10, TGF- β , TNF- α , IL-6, VEGF, and HGF were quantified via ELISA. Cryogenic processing significantly reduced post-thaw cell survival relative to fresh controls, though cellular viability safely remained high (87.32 ± 2.91 % vs. 100.00 ± 3.67 %; $P < 0.001$). At the transcriptomic tier, Cryo-MSCs displayed a profound downregulation of all key immunomodulatory transcripts ($P < 0.05$), with *Il10*, *Tgfb1*, and *Ido1* levels dropping to 0.68 ± 0.07 , 0.77 ± 0.06 , and 0.61 ± 0.06 , respectively. This matched a 21.58 % and 21.87 % drop in secreted IL-10 and TGF- β protein concentrations ($P \leq 0.05$), running parallel to a 15 % to 20 % loss in the paracrine release of VEGF and HGF ($P \leq 0.01$). Conversely, cryogenic shock triggered an acute stress response that severely inverted the mitochondrial apoptosis ratio, inducing a significant 1.61-fold upsurge in pro-apoptotic *Bax* and a 1.49-fold increase in executioner *Casp3* transcripts, coupled with a 30.0 % reduction in survival-associated *Bcl2* mRNA ($P \leq 0.05$). This transcriptomic disruption reprogrammed the post-thaw secretome toward an inflammatory phenotype, characterized by a dramatic 2.12-fold and 1.59-fold escalation in secreted TNF- α and IL-6 protein levels, respectively ($P \leq 0.05$). Standard cryopreservation effectively preserves cell viability but causes a temporary operational impairment encompassing transcriptomic suppression of immunomodulatory networks, downregulatory trophic trends, and accelerated apoptotic signaling. These findings reveal compromised functional quality post-thaw, highlighting the clinical necessity for an optimized post-thaw acclimation incubation period prior to cell administration.

Keywords: mesenchymal stem cells (MSCs), cryopreservation, cell viability, immunomodulatory gene expression, cytokine secretion profile, paracrine trophic activity.

Порівняльне дослідження нативних і кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин шурів: життєздатність клітин, експресія імунологічних генів і продукція цитокінів

Г. Х. Есмаел

Факультет ветеринарної
медицини, Університет
Аль-Кадісія,
м. Ед-Діванія,
провінція Аль-Кадісія,
Ірак

Кріоконсервація є фундаментальним біопроцесом для банкінгу мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), проте цикл заморожування-розморожування спричиняє субклітинний стрес, що потенційно модифікує посткріогенний геномний та секреторний профіль клітин. Це дослідження мало на меті порівняти біологічну, молекулярну та функціональну стабільність нативних і кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку шурів (*Rattus norvegicus* BM-MSCs) після розморожування. МСК кісткового мозку шурів було розподілено на дві групи: некріоконсервовані контрольні клітини (Fresh-MSCs) та клітини, заморожені протягом 4 тижнів у рідкому азоті з використанням 10 % диметилсульфоксиду (Cryo-MSCs). Вживання клітин визначали за допомогою колориметричного аналізу з використанням 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду. Рівні експресії імунорегуляторних (*Il10*, *Tgfb1*, *Ido1*) та апоптичних (*Bax*, *Casp3*, *Bcl2*) транскриптів оцінювали методом зворотної транскрипції з наступною кількісною ПЛР у реальному часі (3T-кПЛР). Концентрації секретованих білків IL-10, TGF- β , TNF- α , IL-6, VEGF та HGF у супернатанті кількісно визначали за допомогою імуноферментного аналізу (ELISA). Процес кріоконсервації призвів до статистично значущого зниження виживання клітин після розморожування відносно нативного контролю, хоча життєздатність клітин залишалася на безпечно високому функціональному рівні (87.32 ± 2.91 проти 100.00 ± 3.67 %; $P < 0.001$). На транскрипційному рівні у групі Cryo-MSCs виявлено глибоке пригнічення експресії всіх ключових імуномодуляторних транскриптів ($P \leq 0.05$), при цьому рівні *Il10*, *Tgfb1* та *Ido1* знизилися до 0.68 ± 0.07 , 0.77 ± 0.06 та 0.61 ± 0.06 відповідно. Це узгоджувалося з падінням концентрацій секретованих протизапальних білків IL-10 та TGF- β на 21,58 та 21,87 % ($P \leq 0.05$), що відбувалося паралельно з втратою приблизно від 15 до 20 % паракринної секреції факторів VEGF та HGF ($P \leq 0.01$). Навпаки, кріогенний шок активував гостру стресову відповідь, яка суттєво порушила мітохондріальне співвідношення маркерів апоптозу, викликаючи значуще 1,61-кратне зростання проапоптичного транскрипту *Bax* та 1,49-кратне підвищення рівня ефекторної каспази *Casp3* на тлі 30,0 % зниження мРНК антиапоптичного гена *Bcl2* ($P \leq 0.05$). Виявлені зміни експресії генів призвели до функціонального перепрограмування секретому кріоконсервованих клітин після розморожування у бік запального фенотипу, що характеризувалося різким підвищенням рівнів секретованих білків TNF- α та IL-6 у 2,12 та 1,59 рази відповідно ($P \leq 0.05$). Стандартна кріоконсервація ефективно зберігає життєздатність клітин, проте викликає тимчасове погіршення їхнього функціонального стану, що охоплює транскрипційне пригнічення імуномодуляторних мереж, тенденцію до зниження продукції трофічних факторів та активацію проапоптичних сигнальних шляхів. Отримані результати свідчать про зниження функціональної якості МСК безпосередньо після розморожування, що підкреслює клінічну необхідність оптимізації періоду реакліматизації або інкубації клітинного продукту перед його введенням.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), кріоконсервація, життєздатність клітин, експресія імуномодуляторних генів, профіль секреції цитокінів, паракринна трофічна активність.



Бібліографічний опис для цитування: Есмаел Г. Х. Порівняльне дослідження нативних і кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин шурів: життєздатність клітин, експресія імунологічних генів і продукція цитокінів. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 193–204.

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) represent a fundamental cornerstone of modern regenerative medicine and cellular biotechnology due to their extensive multilineage differentiation potential and potent immunomodulatory properties. Rather than relying solely on direct cellular replacement, these multipotent progenitors exert robust, long-range therapeutic effects that are primarily mediated by the active secretion of a dynamic secretome, which encompasses various pro-survival cytokines, angiogenic trophic factors, and anti-inflammatory macromolecules [1]. This complex paracrine signaling network allows MSCs to effectively modulate the host immune microenvironment, suppress excessive effector lymphocyte activation, and actively stimulate endogenous tissue repair pathways. Consequently, MSC-based cell therapies and cell-free products are being widely investigated globally for the clinical management of severe autoimmune diseases (such as systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis), complex musculoskeletal disorders, chronic non-healing wounds, and progressive neurodegenerative conditions [2, 3].

Given their critical importance in clinical and research applications [4], establishing reliable long-term storage methods is essential. Cryopreservation protocols typically utilize ultra-low temperature storage in liquid nitrogen combined with dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant to prevent intracellular ice crystal formation during the freezing and thawing cycles [5, 6]. However, the cryopreservation process itself poses significant challenges regarding its potential impact on the biological characteristics of MSCs. The physiological stresses of freezing and thawing often induce oxidative damage, osmotic shock, mitochondrial dysfunction, and cell membrane injury, which collectively compromise post-thaw cell viability [7].

Accumulating evidence indicates that cryopreserved MSCs frequently exhibit a reduced proliferative capacity, altered immunomodulatory activity, impaired paracrine secretion, and accelerated rates of apoptosis immediately after thawing compared with their fresh counterparts, thereby potentially diminishing their therapeutic efficacy [7]. The functional discrepancies between freshly isolated and cryopreserved-thawed MSCs – including variations in anti-inflammatory cytokine profiles and specific gene expression levels – remain a subject of intense investigation [2]. These biological alterations are largely dictated by specific cryopreservation protocols, storage duration, thawing rates, and the toxicity of cryoprotective agents. Therefore, comprehensive comparative studies are urgently required to systematically evaluate the molecular and functional consequences of cryopreservation [8].

The aim of the study

The present study aimed to comprehensively evaluate and compare the functional stability of freshly isolated and cryopreserved-thawed rat bone marrow mesenchymal stem cells (*Rattus norvegicus* BM-MSCs). Specifically, the current work was designed to investigate the

immediate impact of the freeze–thaw cycle on essential post-thaw biological activities by systematically assessing cellular viability, apoptosis-associated genomic shifts, immunomodulatory gene expression patterns, and the quantitative paracrine secretion profiles of key cytokines and growth factors.

Materials and methods

Study design

The present study was conducted *in vitro* to systematically evaluate and compare the biological, molecular, and functional characteristics of fresh and cryopreserved rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs). The experimental parameters focused on assessing cell viability, apoptosis-related gene expression profiles, immunomodulatory gene transcription, and the paracrine secretion of cytokines and growth factors.

MSCs culture and expansion

Rat BM-MSCs were obtained from Cell Biologics Company (USA). The cells were maintained and expanded under standardized culture conditions in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin-streptomycin, and L-glutamine. Cultured cells were incubated in a humidified atmosphere at 37°C with 5 % CO₂. The culture medium was routinely replenished every 48 hours. To ensure physiological and phenotypic stability, cells at low passages (passages 3–5) were utilized for all downstream experimental procedures.

Experimental groups

To investigate the precise effects of the freeze–thaw cycle, the expanded BM-MSCs were divided into two distinct experimental groups:

- Group 1 (Fresh-MSCs): Cultured cells maintained continuously under standard incubation conditions without undergoing cryopreservation.

- Group 2 (Cryo-MSCs): Cells subjected to ultra-low temperature cryopreservation and subsequently thawed for analysis.

To ensure statistical reliability, all independent experimental runs were performed in triplicate.

Cryopreservation and thawing protocols

For the cryopreservation procedure, BM-MSCs were harvested utilizing 0.25 % trypsin-EDTA, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended at a definitive density of 1×10^6 cells/mL. The cryopreservation medium consisted of 90 % FBS and 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotective agent [5, 6]. Cell suspensions were transferred to cryovials and initially cooled at a controlled rate of $-1^\circ\text{C}/\text{minute}$ using a specialized freezing container before storage at -80°C . After 24 hours, the cryovials were transferred to liquid nitrogen (-196°C) for a long-term storage period of 4 weeks.

For the thawing procedure, the cryovials were rapidly removed from liquid nitrogen and immediately submerged in a water bath at 37°C with gentle agitation. To mitigate the cytotoxic effects of DMSO upon thawing,

the cell suspension was immediately diluted with a 10-fold volume of fresh pre-warmed culture medium. The cells were then centrifuged at $300 \times g$ for 5 minutes, and the resulting pellet was resuspended in fresh complete culture medium. The thawed BM-MSCs were cultured overnight to allow cellular stabilization prior to subsequent biological and molecular analyses.

Cell viability assay

Cell viability was quantitatively evaluated using the standard 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, BM-MSCs from both experimental groups were seeded into 96-well culture plates at a density of 5×10^3 cells per well and maintained in a humidified incubator. Following the overnight stabilization period, the MTT reagent (5 mg/mL) was added to each well, and the plates were incubated at 37°C for an additional 4 hours. After incubation, the supernatant was carefully removed, and

the resulting converted intracellular formazan crystals were completely dissolved in DMSO. The absorbance of each well was measured at a wavelength of 570 nm using a microplate reader. Post-thaw cell viability was calculated and expressed as a percentage relative to the control group (Fresh-MSCs), which was defined as 100 % viable.

Primer design and synthesis

Oligonucleotide primers for the target rat genes were strategically designed using the online Primer3Plus software, based on reference mRNA sequences retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database. All primers were commercially synthesized and purified. The specific forward (F) and reverse (R) primer sequences, along with their expected amplicon sizes and NCBI reference sequence numbers, are comprehensively detailed in **Table 1**.

Table 1

Oligonucleotide primer sequences used for quantitative real-time PCR analysis

Target gene	Forward primer sequence (5'–3')	Reverse primer sequence (5'–3')	Product size (bp)	NCBI RefSeq accession No.
<i>Il10</i>	CCTGCTCTTACTGGCTGGAG	TGTCCAGCTGGTCCTTCTTT	188	NM_012854.2
<i>Tgfb1</i>	CTGGAGGCTGAGGCAATAAG	AGAAGGCAGAGGTGAGTGGA	225	NC_086019.1
<i>Ido1</i>	CGTGGATCCAGACACCTTTT	GGCTGGAGGCATGTACTCTC	247	NM_023973.2
<i>Bax</i>	TGCAGCCTTTGTCTCTTTT	GGGACGGCTCACACTGTAAT	159	NC_086019.1
<i>Casp3</i>	GATTCAACGCTGAGCAAACA	CTCCAAGGGCCTAGATTTC	227	NC_086034.1
<i>Bcl2</i>	GCCAGTGTGGCTTTACCAT	CTACTGCCGAAAATGGTGGT	150	NC_086031.1

RNA extraction and quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Total RNA extraction from both Fresh-MSCs and Cryo-MSCs was performed utilizing a commercially available total RNA isolation kit according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of the isolated RNA were spectrophotometrically assessed. Total RNA was subsequently reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) using a high-capacity cDNA reverse transcription kit. Quantitative real-time PCR (qPCR) amplifications were performed using a SYBR Green PCR Master Mix on a real-time PCR detection system. The relative expression levels of the target genes (*Il10*, *Tgfb1*, *Ido1*, *Bax*, *Casp3*, and *Bcl2*) were measured and normalized to the expression of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), which served as the internal housekeeping reference gene. The relative fold changes in gene expression were calculated using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (the Livak method) [10].

Cytokine and growth factor quantification via ELISA

To evaluate the paracrine secretory profile, the cell culture supernatants were harvested 24 hours post-seeding. The collected media were centrifuged to remove residual cellular debris and stored in aliquots at -80°C until further analysis. Commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were utilized to quantitatively determine the protein concentrations of interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor-beta (TGF- β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), vascular endothelial growth factor (VEGF), and hepatocyte growth factor (HGF).

The absorbance of each sample was measured using a microplate reader at the recommended wavelength, and final protein levels were calculated based on the respective standard curves generated according to the manufacturer's technical directions.

Statistical Analysis

All experimental procedures were performed independently in triplicate, and the resulting data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analyses were executed using GraphPad Prism software (version 10.0; GraphPad Software, USA). Discrepancies and differences between the two experimental groups (Fresh-MSCs vs. Cryo-MSCs) were systematically evaluated utilizing the independent-samples Student's *t*-test. Statistical significance was predefined and established at a threshold of $P < 0.05$.

Results and discussion

Cell viability analysis

To evaluate the immediate impact of the freeze – thaw cycle on cellular survival, post-thaw cell viability was quantitatively assessed via the colorimetric MTT assay and systematically compared with that of the non-cryopreserved control population, as detailed in **Table 2**. This enzymatic evaluation was fundamentally based on the capacity of mitochondrial succinate dehydrogenase enzymes within metabolically active, surviving BM-MSCs to reduce the yellow tetrazolium salt into insoluble purple formazan crystals. The quantitative optical density profiles, which directly correlate with the total pool of structurally intact and viable cells surviving the

cryopreservation and thawing protocols, were precisely captured to map the exact percentage of cellular recovery.

Table 2

Quantitative evaluation of post-thaw cell viability in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs via MTT assay, Mean±SD

Experimental group	Cell viability, %	Statistical significance
Fresh-MSCs	100.00±3.67	a
Cryo-MSCs	87.32±2.91	b
P-value	< 0.001	*

Note: Different superscript letters (a, b) within the same column indicate a statistically significant difference between the experimental groups ($P \leq 0.01$). Asterisk (*) denotes high statistical significance ($P < 0.001$).

The quantitative analysis demonstrated that the cryopreservation and thawing processes induced a highly significant reduction in cellular survival capacity compared with the non-cryopreserved control population ($P < 0.001$). Specifically, cell viability was significantly decreased in the Cryo-MSCs group relative to the baseline Fresh-MSCs group ($P < 0.001$, **Table 2**). These experimental data confirm that cryogenic stress triggers a statistically verified wave of cell mortality; however, the absolute majority of the rat bone marrow mesenchymal stem cells successfully survived the utilized storage and thawing protocol, maintaining robust baseline viability.

Expression of immunomodulatory genes

To evaluate the molecular alterations underlying the immunomodulatory potential of rat BM-MSCs following cryogenic stress, the relative mRNA transcription levels of interleukin-10 (*Il10*), transforming growth factor-beta 1 (*Tgfb1*), and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (*Ido1*) were quantitatively analyzed via RT-qPCR, with the comparative datasets detailed in **Table 3**.

Table 3

Relative mRNA expression levels of immunomodulatory genes (*Il10*, *Tgfb1*, and *Ido1*) in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs, Mean±SD

Target gene	Fresh-MSCs	Cryo-MSCs	Statistical significance
<i>Il10</i>	1.00±0.09 (a)	0.68±0.07 (b)	*
<i>Tgfb1</i>	1.00±0.10 (a)	0.77±0.06 (b)	*
<i>Ido1</i>	1.00±0.08 (a)	0.61±0.06 (b)	*

Note: Data are expressed as relative fold changes ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) normalized to the baseline of the Fresh-MSCs group (defined as 1.00). Different letters (a, b) within the same row indicate a statistically significant difference between the experimental groups ($P \leq 0.05$). The asterisk (*) denotes a statistically significant downregulation.

The real-time PCR analysis demonstrated a statistically significant downregulation in the transcriptional activity of all investigated immunomodulatory markers within the cryopreserved cell population post-thaw ($P \leq 0.05$). Specifically, the relative mRNA expression levels of *Il10*, *Tgfb1*, and *Ido1* were significantly decreased in the Cryo-MSCs group compared with the non-cryopreserved control population ($P \leq 0.05$, **Table 3**). These molecular findings confirm that while cells remain structurally intact and viable, cryogenic processing triggers a significant operational suppression of key anti-inflammatory and immunosuppressive transcripts immediately after the thawing procedure.

Real-time PCR kinetic analysis for *Il10* gene

The transcriptional amplification kinetics and threshold cycle values for the targeted anti-inflammatory gene were systematically monitored in real time, with the representative fluorescence accumulation curves for both experimental groups depicted in **Figure 1**.

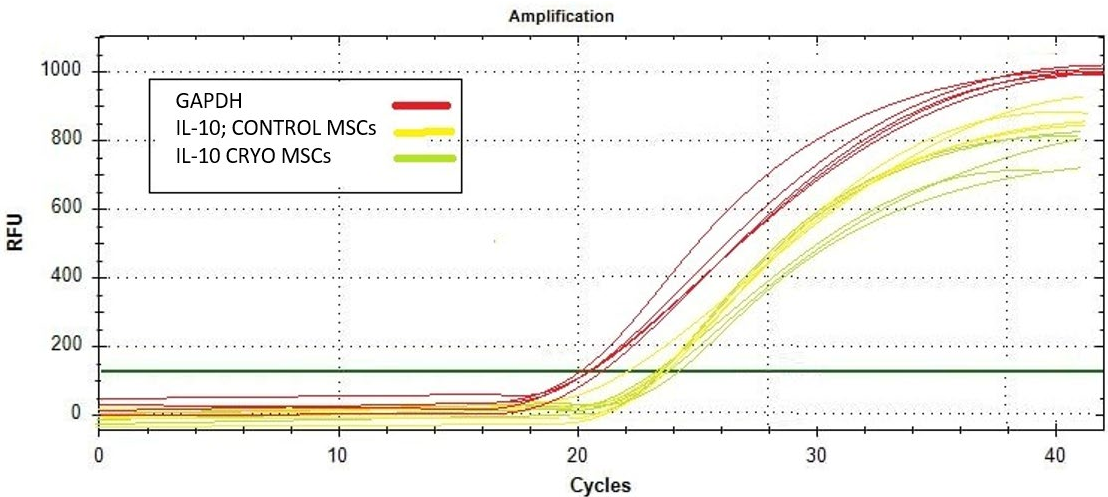


Fig. 1. Real-time PCR amplification curves for the *Il10* gene in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs groups

The kinetic magnification profiles illustrate the real-time exponential accumulation of fluorescence signal for the target *Il10* transcript relative to the internal reference gene (*Gapdh*). The threshold cycle (C_t) values, represented by the intersection points of the amplification curves with the fixed horizontal baseline (green line), show a clear rightward shift for the cryopreserved cell

population (Cryo-MSCs) compared with the non-cryopreserved control group (Fresh-MSCs). This graphical shift in amplification curves directly reflects a higher C_t value, visually demonstrating a substantial reduction in the baseline template copy number of *Il10* mRNA in mesenchymal stem cells immediately following the freeze – thaw and cryopreservation procedures.

Real-time PCR kinetic analysis for *Tgfb1* gene

The transcriptional amplification kinetics and corresponding threshold cycle values for transforming growth factor-beta 1 were continuously recorded during

the exponential phase of the reaction, with the comparative fluorescence accumulation curves illustrated in [Figure 2](#).

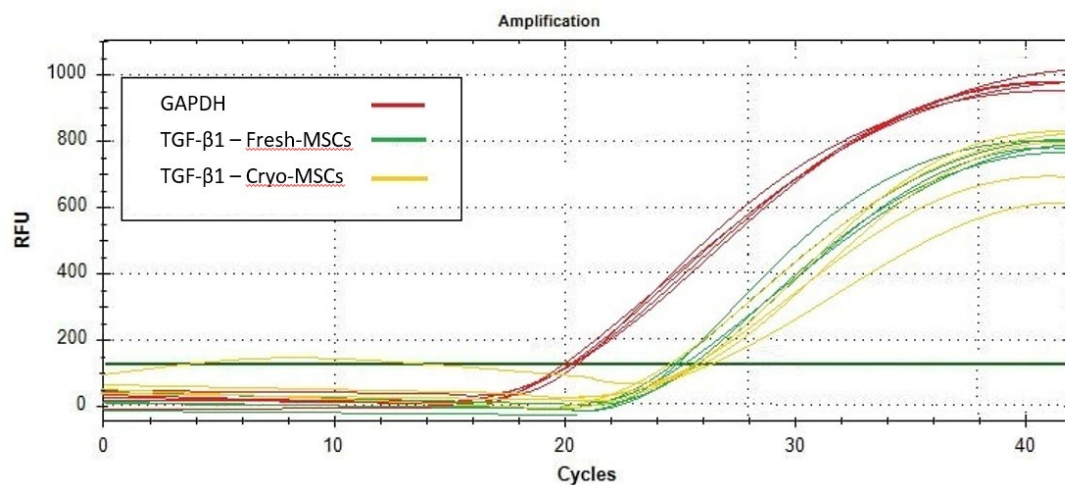


Fig. 2. Real-time PCR amplification curves for the *Tgfb1* gene in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs groups

The real-time amplification profiles track the logarithmic accumulation of the fluorescent signal for the target *Tgfb1* gene and the internal control (*Gapdh*). The point of intersection where the amplification signal crosses the baseline threshold (indicated by the horizontal green line) demonstrates a noticeable rightward delay for the cryopreserved cell sample (Cryo-MSCs) relative to the fresh sample (Fresh-MSCs). This spatial shift on the horizontal axis indicates an increased threshold cycle (C_t) value for the Cryo-MSCs, visually substantiating a marked decrease in the

initial amount of target *Tgfb1* mRNA transcripts in the cells after undergoing the cryopreservation and thawing protocol.

Real-time PCR kinetic analysis for *Ido1* gene

The transcriptional amplification kinetics and corresponding threshold cycle values for indoleamine 2,3-dioxygenase 1 were continuously recorded during the exponential phase of the reaction, with the comparative fluorescence accumulation curves illustrated in [Figure 3](#).

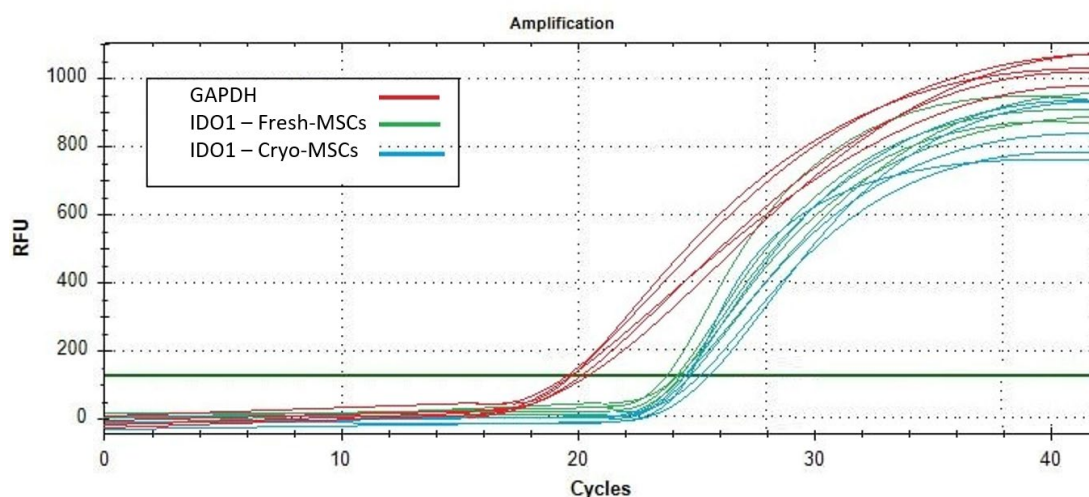


Fig. 3. Real-time PCR amplification curves for the *Ido1* gene in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs groups

The real-time amplification profiles track the logarithmic accumulation of the fluorescent signal for the target *Ido1* gene and the internal control (*Gapdh*). The point of intersection where the amplification signal crosses the baseline threshold (indicated by the horizontal green line) demonstrates a noticeable rightward delay for the cryopreserved cell sample

(Cryo-MSCs) relative to the fresh sample (Fresh-MSCs). This spatial shift on the horizontal axis indicates an increased threshold cycle (C_t) value for the Cryo-MSCs, visually substantiating a marked decrease in the initial amount of target *Ido1* mRNA transcripts in the cells after undergoing the cryopreservation and thawing protocol.

Expression of apoptosis-related genes

To systematically evaluate the molecular pathways triggering programmed cell death following cryogenic stress, the relative mRNA transcription levels of the pro-apoptotic markers (*Bax*, *Casp3*) and the anti-apoptotic regulator (*Bcl2*) were quantitatively analyzed via RT-qPCR, with the comparative datasets detailed in [Table 4](#).

Table 4

Relative mRNA expression levels of apoptosis-related genes (*Bax*, *Casp3*, and *Bcl2*) in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs, Mean $\pm$ SD

Target gene	Fresh-MSCs	Cryo-MSCs	Statistical significance
<i>Bax</i>	1.00 $\pm$ 0.03 (b)	1.61 $\pm$ 0.11 (a)	*
<i>Casp3</i>	1.00 $\pm$ 0.08 (b)	1.49 $\pm$ 0.10 (a)	*
<i>Bcl2</i>	1.00 $\pm$ 0.02 (a)	0.70 $\pm$ 0.09 (b)	*

Note: Data are expressed as relative fold changes ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) normalized to the baseline of the Fresh-MSCs group (defined as 1.00). Different letters (a, b) within the same row indicate a statistically significant difference between the experimental groups ($P\leq 0.05$). The asterisk (*) denotes a statistically significant alteration.

The real-time PCR analysis demonstrated a highly significant molecular shift toward the transcriptional activation of programmed cell death pathways within the cryopreserved cell population post-thaw ($P\leq 0.05$). Specifically, the relative mRNA expression levels of the key pro-apoptotic initiator *Bax* and the main executioner caspase *Casp3* were significantly increased in the Cryo-MSCs group compared with the baseline fresh control population ($P\leq 0.05$, [Table 4](#)). Concurrently, the transcriptional activity of the vital survival-associated gene *Bcl2* was significantly decreased in the stored cells ($P\leq 0.05$). This simultaneous disruption of the pro- and anti-apoptotic genomic balance confirms that cryogenic processing directly triggers an activation of downstream caspase-dependent apoptotic mechanisms immediately after thawing.

Real-time PCR kinetic analysis for *Bax* gene

The transcriptional amplification kinetics and threshold cycle values for the targeted pro-apoptotic gene were monitored in real time during the reaction, with the representative fluorescence accumulation curves for both experimental groups illustrated in [Figure 4](#).

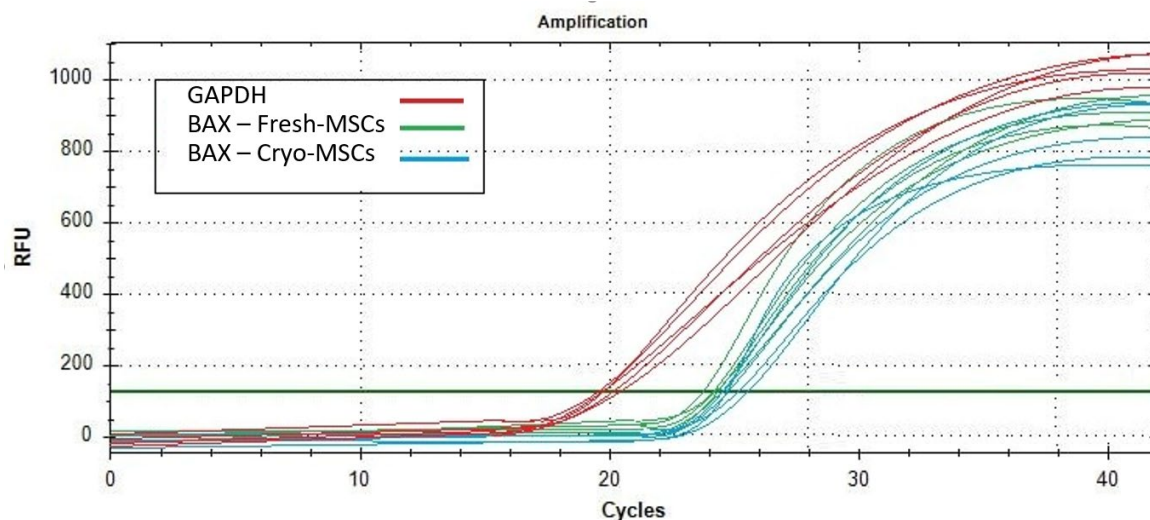


Fig. 4. Real-time PCR amplification curves for the pro-apoptotic *Bax* gene in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs groups

The real-time amplification profiles track the logarithmic accumulation of the fluorescent signal for the target pro-apoptotic *Bax* gene relative to the internal housekeeping control (*Gapdh*). The threshold cycle (C_t) values, represented by the points where the fluorescence amplification signals cross the fixed horizontal baseline (green line), demonstrate a distinct leftward shift for the cryopreserved cell population (Cryo-MSCs) compared with the non-cryopreserved fresh control group (Fresh-MSCs). This spatial shift on the horizontal axis indicates a significantly lower C_t value for the Cryo-MSCs, visually confirming an immediate post-thaw upsurge in template copy numbers and demonstrating that cryogenic processing triggers an immediate transcriptional activation of cell-death pathways.

Real-time PCR kinetic analysis for *Casp3* gene

The transcriptional amplification kinetics and threshold cycle values for the major executioner caspase

gene were monitored in real time during the reaction, with the representative fluorescence accumulation curves for both experimental groups illustrated in [Figure 5](#).

The real-time amplification profiles track the logarithmic accumulation of the fluorescent signal for the target apoptotic gene *Casp3* relative to the internal housekeeping control (*Gapdh*). The threshold cycle (C_t) values, represented by the points where the fluorescence amplification signals cross the fixed horizontal baseline (green line), demonstrate a distinct leftward shift for the cryopreserved cell population (Cryo-MSCs) compared with the non-cryopreserved fresh control group (Fresh-MSCs). This spatial shift on the horizontal axis indicates a significantly lower C_t value for the Cryo-MSCs, visually confirming an immediate post-thaw upsurge in template copy numbers and demonstrating that cryogenic processing triggers an immediate transcriptional activation of downstream caspase-dependent apoptotic pathways.

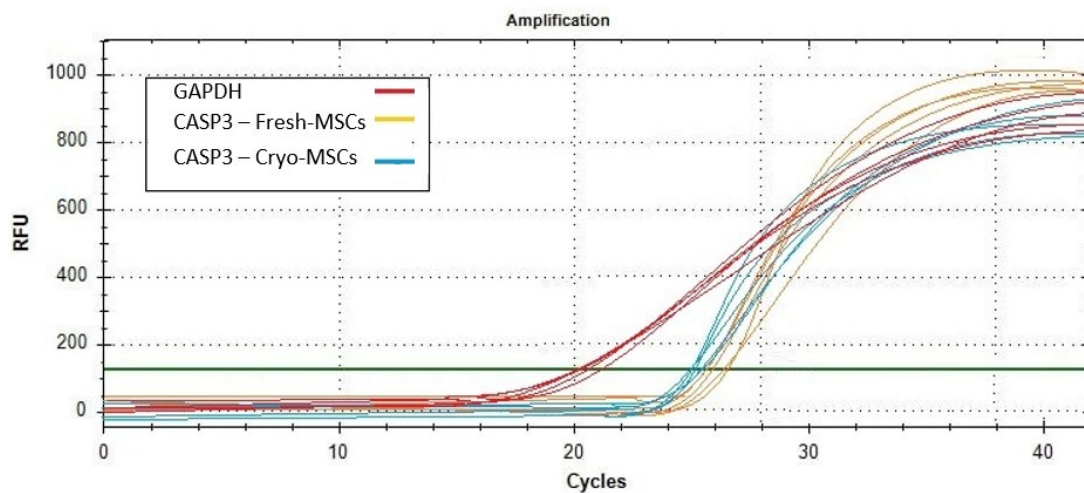


Fig. 5. Real-time PCR amplification curves for the executioner *Casp3* gene in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs groups

Real-time PCR kinetic analysis for *Bcl2* gene

The transcriptional amplification kinetics and corresponding threshold cycle values for the protective anti-apoptotic regulator gene were monitored in real

time during the reaction, with the representative fluorescence accumulation curves for both experimental groups illustrated in **Figure 6**.

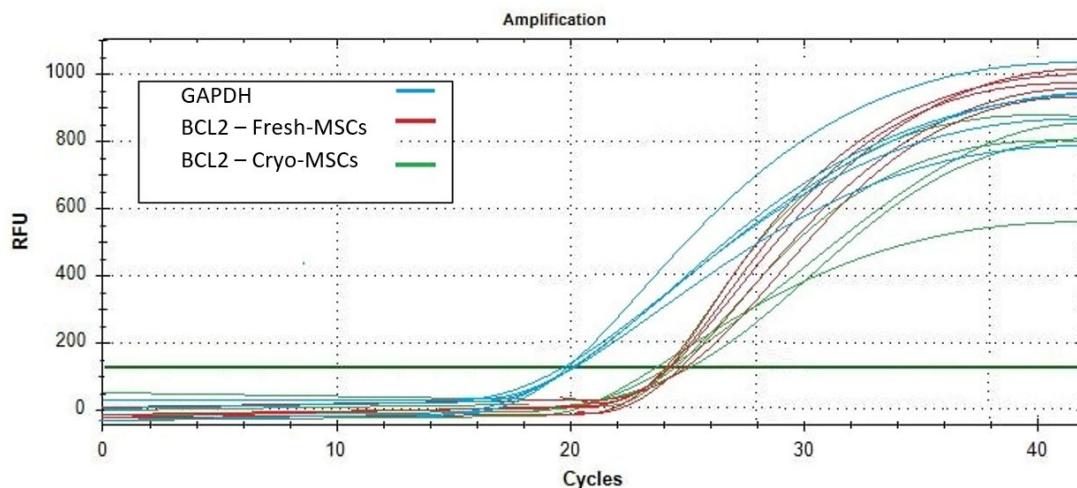


Fig. 6. Real-time PCR amplification curves for the anti-apoptotic *Bcl2* gene in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs groups

The real-time amplification profiles track the logarithmic accumulation of the fluorescent signal for the target survival-associated gene *Bcl2* relative to the internal housekeeping control (*Gapdh*). The threshold cycle (C_t) values, represented by the points where the fluorescence amplification signals cross the fixed horizontal baseline (green line), demonstrate a distinct rightward delay for the cryopreserved cell population (Cryo-MSCs) compared with the non-cryopreserved fresh control group (Fresh-MSCs). This spatial shift on the horizontal axis indicates a significantly higher C_t value for the Cryo-MSCs, visually substantiating a marked downregulation of protective anti-apoptotic transcripts following cryogenic processing and confirming that the freeze – thaw stress compromises the cellular survival machinery.

Cytokine secretion profile

To evaluate the impact of cryogenic stress on the paracrine immunomodulatory activity of rat BM-MSCs, the concentrations of key anti-inflammatory (IL-10, TGF-

β) and pro-inflammatory (TNF- α , IL-6) cytokines secreted into the culture supernatant were quantitatively measured via ELISA, with the comparative data detailed in **Table 5**.

Table 5

Concentrations of secreted cytokines (IL-10, TGF- β , TNF- α , and IL-6) in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs supernatants, Mean $\pm$ SD

Cytokine	Fresh-MSCs, pg/mL	Cryo-MSCs, pg/mL	Statistical significance
IL-10	197.40 $\pm$ 8.80 (a)	154.80 $\pm$ 7.70 (b)	*
TGF- β	439.80 $\pm$ 17.40 (a)	343.60 $\pm$ 13.30 (b)	*
TNF- α	13.60 $\pm$ 2.40 (b)	28.90 $\pm$ 3.60 (a)	*
IL-6	24.40 $\pm$ 2.80 (b)	38.70 $\pm$ 2.10 (a)	*

Note: Different letters (a, b) within the same row indicate a statistically significant difference between the experimental groups ($P \leq 0.05$). The asterisk (*) denotes a high level of statistical significance ($P < 0.05$).

The quantitative protein analysis revealed a definitive, statistically significant shift in the paracrine secretory profile of stored cells post-thaw, characterized by a

suppression of protective factors and a concurrent upregulation of inflammatory mediators ($P \leq 0.05$, [Table 5](#)). Specifically, the secretion of vital anti-inflammatory cytokines was significantly decreased in the Cryo-MSCs group ($P \leq 0.05$), with IL-10 and TGF- β protein concentrations experiencing a 21.58 % and 21.87 % reduction, respectively, relative to the baseline fresh controls.

Conversely, the release of classical pro-inflammatory cytokines into the supernatant was significantly increased following the freeze – thaw process ($P \leq 0.05$). Quantitatively, secreted TNF- α levels experienced a dramatic 2.12-fold increase ($P \leq 0.05$), effectively more than doubling the baseline level, while IL-6 secretion rose prominently by 1.59-fold ($P \leq 0.05$) in the cryopreserved population compared with the non-cryopreserved control cells. These findings substantiate at the protein level that while cryogenic stabilization maintains cell survival, it triggers a significant functional reprogramming of the MSC secretome, downregulating anti-inflammatory defenses while expanding the release of central inflammatory triggers in multiple times immediately after thawing.

Growth factor secretion profile

To evaluate the impact of the freeze–thaw cycle on the trophic and regenerative potential of rat BM-MSCs, the protein concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) released into the culture supernatant were quantified via ELISA, with the comparative datasets summarized in [Table 6](#).

Table 6

Concentrations of secreted trophic factors (VEGF and HGF) in Fresh-MSCs and Cryo-MSCs supernatants, Mean $\pm$ SD

Growth factor	Fresh-MSCs, pg/mL	Cryo-MSCs, pg/mL	Statistical significance
VEGF	739.90 $\pm$ 24.40 (a)	590.20 $\pm$ 24.80 (b)	*
HGF	911.60 $\pm$ 39.90 (a)	766.90 $\pm$ 29.20 (b)	*

Note: Different letters (a, b) within the same row indicate a statistically significant difference between the experimental groups ($P \leq 0.01$). The asterisk (*) denotes a high level of statistical significance ($P \leq 0.01$).

The enzyme-linked immunosorbent assay revealed a highly significant reduction in the secretory output of trophic and angiogenic factors in mesenchymal stem cells subjected to cryopreservation ($P \leq 0.01$, [Table 6](#)). Specifically, following the freeze–thaw cycle, the paracrine release of vascular endothelial growth factor (VEGF) was significantly decreased by 20.23 % in the Cryo-MSCs group compared with the robust baseline production of the fresh controls ($P \leq 0.01$). Concurrently, the protein levels of the vital regenerative factor hepatocyte growth factor (HGF) were also significantly decreased by 15.87 % post-thaw ($P \leq 0.01$). These results mathematically substantiate at the protein level that cryogenic stresses modify the regenerative identity of the MSC secretome, causing an immediate, measurable impairment in their paracrine therapeutic capacity.

The evaluation of cellular viability post-thawing represents a fundamental metric for assessing the quality and structural preservation of mesenchymal stem cells following cryogenic storage. In the present study, the cryopreservation and thawing cycle induced a statistically significant downregulation in rat BM-MSC survival capacity compared with the freshly isolated control population. Nevertheless, despite the measurable reduction in active cellular numbers, the post-thaw viability remained robust, firmly demonstrating that the critical majority of the BM-MSC pool successfully survived the physiological stresses of ultra-low temperature stabilization, which strongly aligns with earlier methodological findings [9].

The observed decline in post-thaw survival is consistent with documented consensus indicating that cryogenic processing invariably imposes mechanical and osmotic strains on cell membranes. For instance, a precise quantitative assessment of human bone marrow-derived MSCs revealed a comparable immediate drop in post-thaw viability relative to fresh cells [10]. Furthermore, variations in post-thaw survival have been widely linked to specific preservation parameters; prior investigations using diverse cryoprotective formulations reported a broad viability range of 63–81 % depending on the specific agent utilized [11]. Although another study documented a slightly higher post-thaw recovery rate of 94.3 %, the overarching trend of a significant cryopreservation-induced viability decrease remains identical, confirming that the viability rate captured in our experiment tightly falls within previously validated acceptable parameters [12].

It is important to highlight that cryogenic injury does not uniformly result in permanent or severe functional impairment. Several investigators have successfully achieved post-thaw survival rates exceeding 90%, noting that cryopreserved MSC fractions consistently retain the key biological and phenotypic traits characteristic of the fresh parental cell line [13]. This functional resilience is further supported by multi-conditional storage evaluations where cryopreserved cells demonstrated post-thaw viability above 95%, exhibiting rapid metabolic recovery and displaying no significant deviations in differentiation capacity or morphological characteristics compared with non-cryopreserved controls [7].

Prior evidence indicates that cryopreserved MSCs can preserve key phenotypic hallmarks despite exhibiting partial, transient impairments in their multi-lineage differentiation capacity. Consequently, the biological impact of cryogenic stabilization cannot be adequately described by survival rates alone, as a baseline reduction in viability does not necessarily imply that the surviving cellular fraction has lost its overall therapeutic and functional potency [14]. The numerical discrepancies reported across literature primarily reflect variations in experimental conditions, rather than fundamental contradictions in cellular biology. Cryopreservation inherently exposes cells to successive thermodynamic stresses, including acute osmotic shifts, cold shock, and intracellular or extracellular ice crystal formation [15]. The magnitude of this cellular damage is heavily dictated by freezing kinetics, cryoprotectant formulations, and the

baseline cellular physiological state [16]. Therefore, the post-thaw survival rate captured in our study must be interpreted strictly within the context of the utilized protocol parameters. Furthermore, the precise timing of post-thaw analysis plays a critical role, as cryopreservation-associated injury and apoptosis pathways often undergo a progressive escalation during the early post-thawing incubation period [10].

At the transcriptomic level, our study demonstrated that cryogenic processing induces a significant operational suppression of key immunoregulatory genes, including interleukin-10 (*Il10*), transforming growth factor-beta 1 (*Tgfb1*), and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (*Ido1*). These specific molecular markers serve as central components of the MSC-mediated immunosuppressive machinery, where IL-10 and TGF- β 1 drive the resolution of excessive inflammatory immune responses, and IDO1 acts as a pivotal metabolic mediator capable of directly modulating lymphocyte activation and proliferation [17]. Documented consensus establishes that MSC-driven immunoregulation relies on the coordinated expression of these inhibitory networks; however, their relative activation and functional contribution are dynamic and remain highly sensitive to the surrounding cellular microenvironment and the nature of specific inflammatory licensing stimuli [18].

The transcriptional downregulation observed in our experiment is consistent with reports indicating that cryopreservation induces a transient functional alteration in the immunomodulatory phenotype of MSCs. Specifically, thawed cells frequently exhibit an impaired responsiveness to inflammatory licensing signals, such as interferon-gamma (IFN- γ), leading to a severely reduced capacity to upregulate *Ido1* expression and suppress T-cell proliferation immediately post-thaw [19]. Importantly, these compromised properties are typically restored after a short period of post-thaw culture (often within 24 hours), demonstrating that the immediate cryogenic shock reflects an altered metabolic state rather than an irreversible or permanent loss of the intrinsic immunomodulatory potential of MSCs [20].

The parallel reduction of *Il10* and *Tgfb1* transcripts further underscores this temporary operational depression within the broader context of MSC-mediated immune regulation. These molecules do not function as isolated genetic markers; rather, they form an interconnected immunomodulatory network that drives the suppression of T-lymphocyte activation. Prior co-culture investigations have demonstrated a direct correlation between elevated *Il10* and *Tgfb* transcript numbers and the potency of MSC-mediated inhibitory effects on effector cell expansion [21]. Consequently, the significant baseline downregulation of these key immunoregulatory axes captured in our study indicates that cryogenic processing temporarily minimizes the immediate post-thaw anti-inflammatory paracrine capacity of the cells prior to their full metabolic stabilization.

Although literature presents some apparent discrepancies regarding the threshold of functional impairment induced by freezing – with certain trials demonstrating that high post-thaw viability correlates with

a retained capacity to suppress activated T-cells [22] – several compounding factors must be considered.

Crucially, the significant transcriptomic downregulation identified in our study – where relative mRNA levels of *Il10*, *Tgfb1*, and *Ido1* dropped to 0.68 ± 0.07 , 0.77 ± 0.06 , and 0.61 ± 0.06 , respectively – represents only a single regulatory tier of biological activity [12]. This operational depression captured under unstimulated culture conditions reflects a transient post-thaw shock rather than an irreversible loss of potency, as enzyme systems like IDO1 remain highly inducible by environmental danger signals like IFN- γ [20].

Furthermore, while prior works suggested that molecular alterations require extensive subsequent verification at the translational level [8], our transcriptomic findings are directly corroborated by our own protein-level data. The fact that actual IL-10 and TGF- β protein secretion decreased by 21.58 % and 21.87 % in the Cryo-MSCs supernatant mathematically validates that the transcription-level suppression effectively translates into a measurable, immediate impairment of the anti-inflammatory paracrine profile.

This cryogenic suppression of the immunoregulatory machinery is tightly linked to the systematic activation of programmed cell death pathways. Following the freeze – thaw cycle, our data revealed a highly significant shift in the mitochondrial survival ratio, characterized by a 1.61-fold increase in pro-apoptotic *Bax* expression and a 1.49-fold upsurge in executioner *Casp3* transcripts, coupled with a 30.0 % reduction in protective *Bcl2* mRNA.

This precise genomic imbalance provides a robust molecular foundation for the immediate post-thaw cryogenic shock, aligning with baseline stress models where a 1.5-fold to 2-fold acceleration of caspase-dependent apoptotic entry was documented within the early 24-hour post-thaw incubation period [23, 24]. The parallel activation of these cell-death cascades confirms that despite maintaining an acceptable morphological cell survival, cryogenic processing forces a significant fraction of the surviving cellular population to undergo a transient apoptotic stress immediately after the thawing procedure.

The synchronized behavior of *Bax* and *Bcl2* transcripts documented in our experiment further substantiates the involvement of mitochondrial-driven cell death pathways. The intracellular ratio between pro-apoptotic and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family serves as a master rheostat governing mitochondrial outer membrane permeabilization and subsequent cell survival. In the current study, the simultaneous induction of *Bax* and a 30.0 % reduction in *Bcl2* transcripts shifts the intracellular equilibrium toward an environment highly permissive to programmed cell death. This molecular pattern strongly mirrors experimental models of cryoinjury, where the activation of Bcl-2-regulated mitochondrial cascades was heavily implicated in freeze-thaw damage, whereas forced upregulation of protective Bcl-2 proteins consistently shielded cells from cryogenic stress [24].

Crucially, the ultimate impact of cryopreservation on cellular apoptosis must be interpreted as a dynamic, rather than uniform or irreversible, phenomenon. Kinetic

tracking during the early post-thaw period demonstrates that apoptotic signaling typically experiences an acute spike during the initial hours after thawing, followed by a gradual stabilization as the surviving population recovers metabolic equilibrium. Prior evaluations in human MSCs confirmed that cryogenic injury triggers an immediate upsurge in apoptotic cascades within the first 4 hours post-thaw; however, by the 24-hour mark, viability parameters experience a partial recovery alongside a notable decline in active cell death markers [10].

Given that our methodology utilized an overnight incubation period prior to analysis, the 1.61-fold and 1.49-fold elevation in *Bax* and *Casp3* transcripts captured in our study likely reflects the active molecular footprint of this early post-thaw recovery phase, rather than a definitive trajectory toward total population mortality. The ultimate magnitude of this cryoinjury is highly variable, dictated by specific freezing kinetics, cryoprotectant toxicity, cell density, and the composition of the post-thaw culture medium [8]. Because MSCs represent inherently heterogeneous cellular populations, the surviving cellular fraction frequently retains substantial functional and immunomodulatory potency even when elevated apoptotic gene expression remains temporarily detectable at the molecular level [25].

The simultaneous transcriptional upregulation of *Bax* and *Casp3* alongside the concomitant downregulation of *Bcl2* strongly demonstrates that the freeze – thaw process temporarily destabilizes the molecular equilibrium governing cell survival. The absolute magnitude and chronological persistence of this intracellular stress response are highly dependent on specific cryopreservation protocol parameters and the precise post-thaw evaluation window. Consequently, this transient genomic shift should be interpreted as an immediate, adaptive molecular response to cryogenic stress rather than as definitive evidence of irreversible structural loss or total population mortality [23].

At the translational level, this cryogenic stress triggers a distinct, statistically verified functional reprogramming of the mesenchymal stem cell secretome. Our quantitative protein analyses demonstrated a significant paracrine shift away from the highly active immunoregulatory and trophic profile characteristic of fresh cells toward an inflammatory phenotype. Specifically, the fact that the secretion of vital anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β dropped by 21.58 % and 21.87 %, respectively, post-thaw carries substantial clinical relevance, given that these specific mediators drive the suppression of excessive inflammatory signaling and govern peripheral immune-cell activation.

A significant reduction in the baseline release of both factors mathematically validates that cryogenic processing temporarily compromises the immediate capacity of BM-MSCs to establish a protective, anti-inflammatory paracrine microenvironment. However, prior functional recovery models indicate that this altered post-thaw phenotype is transient; the documented restoration of MSC immunomodulatory properties following an appropriate period of post-thaw culture suggests that the immediate post-thaw secretory profile

should not be misinterpreted as representative of the long-term therapeutic potential of the cellular product [7, 26].

The prominent elevation of pro-inflammatory cytokines in our study provides crucial, complementary insights into post-thaw operational dynamics. Rather than experiencing a generalized metabolic shutdown, the cryopreserved cells demonstrated a selective functional redirection. Quantitatively, the fact that secreted TNF- α levels underwent a dramatic 2.12-fold increase and IL-6 production rose significantly by 1.59-fold post-thaw outlines an acute cellular adaptation to cryogenic shock. Mechanistically, TNF- α operates as a central driver of inflammatory cascades capable of autocrine modification of stem cell behavior, whereas IL-6 functions as a classic pleiotropic cytokine that participates in both pro-inflammatory signaling and tissue regeneration depending on localized concentrations and microenvironmental signals [27, 28]. Crucially, this temporary translational upsurge reflects a metabolic adaptation to freeze – thaw stress rather than a permanent phenotypic conversion toward a classically pro-inflammatory lineage.

This paracrine shift is further characterized by a significant, synchronized suppression of vital angiogenic and trophic factors. Our data revealed that post-thaw VEGF and HGF protein levels dropped significantly by 20.23 % and 15.87 %, respectively, relative to the highly active baseline controls. Both VEGF and HGF serve as vital orchestrators of tissue repair, vascular remodeling, and host cell survival within the MSC secretome [29, 30]. This measurable post-thaw reduction mathematically confirms that cryogenic stress temporarily impairs the immediate regenerative identity of the cells, which carries substantial therapeutic relevance when cryopreserved cellular products are intended for immediate post-thaw clinical applications relying heavily on paracrine-mediated tissue regeneration.

The sharp divergence in secretory kinetics – where specific trophic and anti-inflammatory molecules significantly decline while pro-inflammatory triggers concurrently double – substantiates that the freeze–thaw process alters the programmatic pattern of secretion itself, rather than inducing a non-specific reduction in total cellular metabolic output [31, 32]. Nevertheless, these secretory alterations must be interpreted with caution due to the high inherent variability of mesenchymal stem cell preparations. Phenotypic fluctuations in the post-thaw secretome are heavily dictated by baseline cell density, passage number, tissue source, cryoprotectant concentrations, and the precise window of post-thaw analysis [31]. Consequently, the observed functional disruption reflects an immediate, temporary disturbance in the programmatic signaling balance between immunoregulatory, inflammatory, and trophic factor networks before full cellular stabilization is achieved [10].

Several limitations of the current investigation must be acknowledged. First, this research was executed strictly under *in vitro* conditions; consequently, the documented molecular and secretory kinetics may vary within an *in vivo* physiological microenvironment. Second, while this study provided a comprehensive evaluation of central immunomodulatory, apoptotic, and secretory biomarkers,

it did not evaluate cell migration behavior, multi-lineage differentiation potential, or post-thaw histopathological changes. Finally, the experimental matrix was restricted to a single standard cryopreservation protocol and cooling rate with a single thawing cycle, highlighting the necessity for future expanding evaluations across diverse cryoprotective conditions.

Conclusions

The present comparative study demonstrates that while standard cryopreservation and thawing protocols successfully maintain rat bone marrow-derived mesenchymal stem cell viability safely above critical limits ($87.32 \pm 2.91\%$; $P < 0.001$), the acute thermodynamic stress induces a transient phenotypic and molecular reprogramming of the cellular product immediately post-thaw. At the genomic tier, cryogenic processing triggers a synchronized operational depression of the immunomodulatory machinery, characterized by a statistically significant downregulation of the vital transcripts *Il10* (to 0.68 ± 0.07), *Tgfβ1* (to 0.77 ± 0.06), and *Ido1* (to 0.61 ± 0.06) ($P \leq 0.05$). Concurrently, at the translational level, this functional suppression is directly confirmed by a 21.58 % and 21.87 % reduction in secreted IL-10 and TGF-β protein concentrations ($P \leq 0.05$), combined with an approximate 15 % to 20 % loss in the paracrine therapeutic secretion of the vital trophic and angiogenic factors VEGF and HGF ($P \leq 0.01$). Furthermore, the immediate post-thaw state is marked by an acute intracellular shock that shifts the genomic equilibrium toward mitochondrial-driven apoptotic pathways, resulting in a prominent 1.61-fold upsurge in pro-apoptotic *Bax* and a 1.49-fold increase in executioner *Casp3* expression, running parallel to a significant 30.0 % reduction in protective *Bcl2* mRNA levels ($P \leq 0.05$). This molecular stress is accompanied by a dramatic functional reprogramming of the MSC secretome toward an inflammatory phenotype, where secreted TNF-α and IL-6 protein levels prominently escalate by 2.12-fold and 1.59-fold, respectively ($P \leq 0.05$).

DECLARATIONS

Ethical Statement

The author declares that this study was conducted using commercially available primary cell lines and strictly did not involve any direct interventions, surgical manipulations, or experimental protocols on live animals. The primary rat bone marrow mesenchymal stem cells (*Rattus norvegicus* BM-MSCs) utilized in the current research matrix were officially sourced from an authorized commercial vendor (Cell Biologics Company, USA); consequently, obtaining formal institutional bioethics committee approval was not required for this investigation.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The author declares no conflicts of interest.

Acknowledgements

The author expresses sincere gratitude to everyone who contributed to this research and supported the completion of this study.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The author declares that AI-assisted technologies were utilized solely to assist with linguistic editing, structural formatting, and the refinement of specific manuscript paragraphs. Artificial intelligence technologies were strictly not employed for the generation, rendering, or formatting of scientific data plots, nor for any statistical analyses or interpretation of the biological results. The author maintains full accountability for the integrity of the content, data accuracy, and final conclusions presented in this study.

References

1. Law, S., & Chaudhuri, S. (2013). Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges. *American Journal of Stem Cells*, 2(1), 22–38.
2. Han, X., Liao, R., Li, X., Zhang, C., Huo, S., Qin, L., Xiong, Y., He, T., Xiao, G., & Zhang, T. (2025). Mesenchymal stem cells in treating human diseases: molecular mechanisms and clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 262. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02313-9>
3. Esmael, G. K., Rebai, T., & Al-Nailey, K. G. C. (2023). Immunomodulatory effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on BALB/c mice model with induced systemic lupus erythematosus (SLE): effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cellular and Molecular Biology*, 69(1), 19–24. <https://doi.org/10.14715/cmb/2022.69.1.4>
4. Song, N., Scholtmeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(9), 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009>
5. Wang, J., & Li, R. (2024). Correction: Effects, methods and limits of the cryopreservation on mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 15(1), 372. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-04001-x>
6. Wang, Y., Yang, K., Yuan, S., Huo, F., Yang, C., & Tian, W. (2026). Research advances in cryopreserved preparations of mesenchymal stem cells: technical innovations, application challenges, and quality control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 14, 1717539. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2026.1717539>
7. Antebi, B., Asher, A. M., Rodriguez, L. A., Moore, R. K., Mohammadipoor, A., & Cancio, L. C. (2019). Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 297. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2038-5>
8. Tan, Y., Salkhordeh, M., Wang, J.-P., McRae, A., Souza-Moreira, L., McIntyre, L., Stewart, D. J., & Mei, S. H. J. (2019). Thawed mesenchymal stem cell product shows comparable immunomodulatory potency to cultured cells in vitro and in polymicrobial septic animals. *Scientific Reports*, 9(1), 18078. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54462-x>
9. Clarke, D. M., Yadock, D. J., Nicoud, I. B., Mathew, A. J., & Heimfeld, S. (2009). Improved post-thaw recovery of peripheral blood stem/progenitor cells using a novel intracellular-like cryopreservation solution. *Cytotherapy*, 11(4), 472–479. <https://doi.org/10.1080/14653240902887242>
10. Bahoun, S., Coopman, K., & Akam, E. C. (2020). Quantitative assessment of the impact of cryopreservation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: up to 24 h post-thaw and beyond. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 540. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02054-2>
11. Ray, S. S., Pramanik, K., Sarangi, S. K., & Jain, N. (2016). Serum-free non-toxic freezing solution for cryopreservation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnology Letters*, 38(8), 1397–1404. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2111-6>

12. Mamo, T., Cox, C. A., Demorest, C., Fontaine, M. J., Hubel, A., Kelley, L., Khan, A., Marks, D. C., Pati, S., Reems, J.-A., Spohn, G., Schäfer, R., Shi, R., Shao, L., Stroncek, D., & McKenna, D. H. (2024). Cryopreservation of mesenchymal stem/stromal cells using a DMSO-free solution is comparable to DMSO-containing cryoprotectants: results of an international multicenter PACT/BEST collaborative study. *Cytotherapy*, 26(12), 1522–1531. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.07.001>
13. Putra, I., Shen, X., Anwar, K. N., Rabiee, B., Samaeekia, R., Almazyad, E., Giri, P., Jabbehdari, S., Hayat, M. R., Elhusseiny, A. M., Ghassemi, M., Mahmud, N., Edward, D. P., Joslin, C. E., Rosenblatt, M. I., Dana, R., Eslani, M., Hematti, P., & Djalilian, A. R. (2021). Preclinical evaluation of the safety and efficacy of cryopreserved bone marrow mesenchymal stromal cells for corneal repair. *Translational Vision Science & Technology*, 10(10), 3. <https://doi.org/10.1167/tvst.10.10.3>
14. Shah, F. S., Li, J., Zanata, F., Curley, J. L., Martin, E. C., Wu, X., Dietrich, M., Devireddy, R. V., Wade, J. W., & Gimble, J. M. (2016). The relative functionality of freshly isolated and cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cells. *Cells Tissues Organs*, 201(6), 436–444. <https://doi.org/10.1159/000446494>
15. Xu, X., Liu, Y., Cui, Z., Wei, Y., & Zhang, L. (2012). Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation. *Journal of Biotechnology*, 162(2–3), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.09.004>
16. Shivakumar, S. B., Bharti, D., Jang, S.-J., Hwang, S.-C., Park, J.-K., Shin, J.-K., Byun, J.-H., Park, B.-W., & Rho, G.-J. (2015). Cryopreservation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells following controlled rate freezing protocol using different cryoprotectants; a comparative study. *International Journal of Stem Cells*, 8(2), 155–169. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2015.8.2.155>
17. Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M., & Mahon, B. P. (2007). Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 149(2), 353–363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x>
18. Holan, V., Hermankova, B., Bohacova, P., Kossel, J., Chudickova, M., Hajkova, M., Krulova, M., Zajicova, A., & Javorkova, E. (2016). Distinct immunoregulatory mechanisms in mesenchymal stem cells: role of the cytokine environment. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(6), 654–663. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9688-y>
19. François, M., Copland, I. B., Yuan, S., Romieu-Mourez, R., Waller, E. K., & Galipeau, J. (2012). Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. *Cytotherapy*, 14(2), 147–152. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.623691>
20. Moll, G., Alm, J. J., Davies, L. C., von Bahr, L., Heldring, N., Stenbeck-Funke, L., Hamad, O. A., Hinsch, R., Ignatowicz, L., Locke, M., Lönnies, H., Lambris, J. D., Teramura, Y., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B., & Le Blanc, K. (2014). Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? *Stem Cells*, 32(9), 2430–2442. <https://doi.org/10.1002/stem.1729>
21. Nasef, A., Chapel, A., Mazurier, C., Bouchet, S., Lopez, M., Mathieu, N., Sensebé, L., Zhang, Y., Gorin, N.-C., Thierry, D., & Fouillard, L. (2006). Identification of IL-10 and TGF- β transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expression*, 13(4), 217–226. <https://doi.org/10.3727/000000006780666957>
22. Zhao, Z.-G., Li, W.-M., Chen, Z.-C., You, Y., & Zou, P. (2008). Hematopoiesis capacity, immunomodulatory effect and ex vivo expansion potential of mesenchymal stem cells are not impaired by cryopreservation. *Cancer Investigation*, 26(4), 391–400. <https://doi.org/10.1080/07357900701788049>
23. Bissoyi, A., & Pramanik, K. (2014). Role of the apoptosis pathway in cryopreservation-induced cell death in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *Biopreservation and Biobanking*, 12(4), 246–254. <https://doi.org/10.1089/bio.2014.0005>
24. Moll, G., Geißler, S., Catar, R., Ignatowicz, L., Hoogduijn, M. J., Strunk, D., Bieback, K., & Ringdén, O. (2016). Cryopreserved or fresh mesenchymal stromal cells: only a matter of taste or key to unleash the full clinical potential of MSC therapy? In K. Bieback, D. Strunk, & G. Geißler (Eds.), *Mesenchymal stromal cells: analytical and technical advancements* (pp. 77–98). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_7
25. Aabling, R. R., Alstrup, T., Kjær, E. M., Poulsen, K. J., Pedersen, J. O., Revenfeld, A. L., Møller, B. K., & Eijken, M. (2023). Reconstitution and post-thaw storage of cryopreserved human mesenchymal stromal cells: Pitfalls and optimizations for clinically compatible formulations. *Regenerative Therapy*, 23, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2023.03.006>
26. Linkova, D. D., Rubtsova, Y. P., & Egorikhina, M. N. (2022). Cryostorage of mesenchymal stem cells and biomedical cell-based products. *Cells*, 11(17), 2691. <https://doi.org/10.3390/cells11172691>
27. Li, W., Liu, Q., Shi, J., Xu, X., & Xu, J. (2023). The role of TNF- α in the fate regulation and functional reprogramming of mesenchymal stem cells in an inflammatory microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 14, 1074863. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1074863>
28. Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Haynesworth, S. E., Bruder, S. P., & Gerson, S. L. (2000). Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *Journal of Hematology & Stem Cell Research*, 9(6), 841–848. <https://doi.org/10.1089/152581600750062264>
29. Hemeda, H., Jakob, M., Ludwig, A.-K., Giebel, B., Lang, S., & Brandau, S. (2010). Interferon- γ and tumor necrosis factor- α differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 19(5), 693–706. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0365>
30. González-González, A., García-Sánchez, D., Dotta, M., Rodríguez-Rey, J. C., & Pérez-Campo, F. M. (2020). Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, 12(12), 1529–1552. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i12.1529>
31. Kehl, D., Generali, M., Mallone, A., Heller, M., Uldry, A.-C., Cheng, P., Gantenbein, B., Hoerstrup, S. P., & Weber, B. (2019). Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. *npj Regenerative Medicine*, 4(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0070-y>
32. Hsiao, S. T.-F., Asgari, A., Lokmic, Z., Sinclair, R., Disting, G. J., Lim, S. Y., & Dilley, R. J. (2012). Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells and Development*, 21(12), 2189–2203. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0674>

ORCID

G. K. Esmail 

<https://orcid.org/0000-0002-1712-9084>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Determination of the lower calorific value of biomass using mechatronic system elementsV. Padalka  | O. Gorbenko | M. Kulyk | M. Chumak**Article info**

Correspondence Author

V. Padalka

E-mail:

viacheslav.padalka@pdau.edu.uaPoltava State Agrarian
University,
Skovoroda Str., 1/3, Poltava,
36000, Ukraine**Citation:** Padalka, V., Gorbenko, O., Kulyk, M., & Chumak, M. (2026). Determination of the lower calorific value of biomass using mechatronic system elements. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 205–210. doi: 10.31210/spi2026.29.02.28

Achieving environmental sustainability requires an immediate transition to energy-saving technologies and renewable energy sources. It has been confirmed that, in addition to classical renewable sources (solar, hydro, wind, and geothermal energy), plant biomass represents a valuable raw material. It enables the sustainable production of biofuels, providing an alternative to fossil fuels. This role of biofuels determines the need for a thorough study and justification of the energy characteristics of relevant renewable agricultural crops. Plant biomass, which includes wood and shrubs of various species, possesses distinctive fuel properties that can be described by well-known parameters such as the heat of combustion (higher and lower calorific values), ash melting characteristics, ash content, and chemical composition. The presented generalization represents a new scientific contribution aimed at developing a methodology and conducting experimental and comparative studies to determine the relative indicators of the calorific value of organic plant-based samples using original and more affordable equipment with elements of mechatronic systems. The dry plant material of each energy crop was analyzed using a laboratory device – a “biofuel analyzer.” The original laboratory setup was manufactured in accordance with applicable technical regulations. The research showed that the results of calorific value measurements of plant biomass obtained with the developed laboratory setup, equipped with mechatronic measuring components, were in good agreement with the data obtained using a standard bomb calorimeter. This consistency is confirmed by statistical significance ($LSD_{0.05}$ at $p < 0.05$). Under the experimental conditions, the calorific value of six plant-based material samples was determined as follows: Castor bean (*Ricinus communis*) – 9.78 MJ/kg; Sorghum (*Sorghum*) – 17.97 MJ/kg; Switchgrass (*Panicum virgatum*) – 14.71 MJ/kg; Paulownia (*Paulownia*) – 10.67 MJ/kg; Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*) – 13.93 MJ/kg; and Sorrel hybrid (*Rumex patientia* × *Rumex tianschanicus*) – 12.35 MJ/kg.

Keywords: biomass, measurement, lower calorific value, energy crops, mechatronic measurement systems.**Визначення нижчої теплоти горіння зразків рослинного походження засобами з елементами мехатронних систем**

В. В. Падалка | О. В. Горбенко | М. І. Кулик | М. В. Чумак

Полтавський державний
аграрний університет,
м. Полтава, Україна

Досягнення екологічної стійкості вимагає негайного переходу до енергозберігаючих технологій та відновлюваних джерел енергії. Підтверджено, що, окрім класичних відновлюваних джерел (сонячна, водна, вітрова та геотермальна енергія), біомаса рослин є цінною сировиною. Вона дає змогу стало виробляти біопаливо, пропонуючи альтернативу викопним видам палива. Саме ця роль біопалива зумовлює необхідність глибокого вивчення та обґрунтування енергетичних характеристик відповідних відновлюваних сільськогосподарських культур. Рослинна біомаса, яка охоплює деревину та чагарники різних порід, має відмінні паливні властивості, які можна описати відомими показниками – теплотою згорання (вищою та нижчою), характеристиками плавлення золи, зольністю, хімічним складом тощо. Наведене узагальнення становить нове наукове рішення, що полягає у розробленні методики та проведенні дослідницьких і порівняльних експериментів із визначення відносних показників теплотворної здатності органічних зразків рослинного походження з використанням оригінального та більш доступного обладнання з елементами мехатронних систем. Рослинну суху сировину кожної з енергетичних культур аналізували на лабораторній установці – «біопаливному аналізаторі». Оригінальна лабораторна установка була виготовлена відповідно до чинних технічних регламентів. Дослідження показали, що результати вимірювань теплотворної здатності рослинної біомаси, отримані на розробленій лабораторній установці з використанням вимірювальних засобів з елементами мехатронних систем, добре узгоджуються з даними, одержаними за допомогою стандартної калориметричної бомби. Це підтверджується статистичною значущістю ($LSD_{0.05}$ при $p < 0.05$). В умовах експерименту було визначено теплотворну здатність шести зразків матеріалу рослинного походження: рицина (*Ricinus communis*) – 9,78 МДж/кг; сорго (*Sorghum*) – 17,97 МДж/кг; свічграс (*Panicum virgatum*) – 14,71 МДж/кг; павловнія (*Paulownia*) – 10,67 МДж/кг; сіда (*Sida hermaphrodita*) – 13,93 МДж/кг; шавнат (*Rumex patientia* × *Rumex tianschanicus*) – 12,35 МДж/кг.

Ключові слова: біомаса, вимірювання, нижча теплота згорання, енергетичні рослини, мехатронні системи вимірювання.**Бібліографічний опис для цитування:** Падалка В. В., Горбенко О. В., Кулик М. І., Чумак М. В. Визначення нижчої теплоти горіння зразків рослинного походження засобами з елементами мехатронних систем. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 205–210.

Introduction

Energy consumption is a fundamental requirement for the existence and development of human civilization [1]. Throughout history, access to energy has been critically important for meeting human needs and improving the quality of life. Most scientific studies are focused on finding ways to reduce energy consumption, particularly in the agro-industrial sector [2–4].

However, the rapid growth of industry over the last centuries has led to a significant increase in energy consumption, which in turn exhausts global reserves of fossil fuels – even under the most optimistic estimates, these resources will last for only about 100 years [5, 6]. Therefore, achieving environmental sustainability requires an urgent transition to energy-saving technologies and renewable energy sources.

A number of studies [7–10] confirm that, in addition to conventional renewable sources (solar, hydropower, wind, and geothermal energy), plant biomass is a valuable raw material for sustainable biofuel production, offering an alternative to fossil fuels. The strategic role of biofuels necessitates an in-depth examination and justification of the energy characteristics of agricultural crops.

A significant proportion of raw materials for biofuel production is derived from agricultural crops. In particular, grain crops such as wheat, barley, corn, oats, and rye, as well as starch-containing plants (potatoes, sugar beet), are used for obtaining bioethanol via fermentation [11, 12]. Simultaneously, grain straw represents a promising solid biomass for direct combustion or pyrolysis [13].

Furthermore, oilseed crops such as rapeseed, sunflower, flax, and mustard, as well as less common species (hemp, safflower, castor bean), serve as sources of oil, which can be converted into biodiesel through transesterification [14, 15]. The use of non-edible oilseed crops is also considered as a strategy to reduce competition with food crops [16]. These approaches enable the integration of plant biomass into energy systems as a renewable resource.

To objectively assess the efficiency and stability of any energy crop, it is necessary to determine key energy indicators such as energy consumed, energy produced, and energy balance. According to studies [17], the energy balance of an agricultural crop is best evaluated through a comprehensive analysis of all physical and thermal characteristics of the resulting plant-based biological material.

Therefore, the development of a methodology for investigating the lower heating value (LHV) of plant-derived samples is a relevant task for addressing the challenge of identifying alternative renewable energy sources – both in Ukraine and worldwide.

The aim of the study

The aim of the research is to develop a methodology and conduct experimental and comparative investigations to determine the relative calorific values of organic plant-derived samples using equipment equipped with elements of mechatronic systems.

Materials and methods

Methodology of Comparative Research on the Characteristics of Organic Plant-Based Samples.

Plant biomass, which includes wood and shrubs of various species, possesses diverse fuel-related properties [18, 19]. These can be described using several well-known characteristics, such as: higher and lower heating value, ash melting behavior (ash content), chemical composition (content of key elements influencing the toxicity of gaseous emissions during combustion), particularly chlorine, carbon, hydrogen, nitrogen, and sulfur; moisture content (relative and absolute); hardness and density; amount of gaseous products; solid carbon content; ash composition and percentage; and slagging tendencies of ash, particulate matter, and biological spores, among others.

According to the general objectives of the research, the laboratory setup enables the assessment of several thermal process parameters [20], particularly the lower heating value (LHV) and ash content during combustion of plant-based biological material samples.

Ash content refers to the percentage of non-combustible residue (on a dry mass basis) formed from the mineral impurities in the fuel during complete combustion and is expressed as a percentage.

The ash content of a dry plant-based sample is determined using the following formula:

$$X^p = \frac{M_{t2}}{M_i} \cdot 100\%, \quad (1)$$

where M_i is the mass of the tested material sample, kg; M_{t2} is the mass of ash of the tested material sample, kg.

The ash mass M_{t2} is determined as the difference between the total ash residue obtained after combustion and the mass of the combustible material used to initiate the combustion process (M_{st2}), which is measured after each experiment.

The ash content recalculated to the absolutely dry sample is determined as follows:

$$X^A = \frac{M_{t2}}{M_i(100 - W_i)} \cdot 100\%, \quad (2)$$

where W_i is the moisture content of the tested material, %.

The mass of ash M_{t2} is also determined as the difference between the total ash residue after combustion and the ash mass of the auxiliary combustible material used to initiate the combustion process (M_{st2}), which is measured after each test.

The relative moisture content W_i of the tested material is determined using the standard thermal method.

Prerequisites for Laboratory Investigations:

1. The tested material, according to its physicochemical properties, belongs to the class of low-flammability substances. Therefore, at the initial stage, it is necessary to expose the sample to an open flame. The heat released by the ignition material must be taken into account when determining the calorific value of the sample.

2. During combustion, the tested material releases energy over time according to a nonlinear characteristic.

This process is an important operational parameter for energy systems using such material as fuel, and therefore it must be studied in the time domain.

3. The lower heating value (LHV) of organic plant-based samples is determined through experimental measurement of the amount of heat accumulated by the energy-absorbing liquid during the combustion of a specific mass of the sample.

4. To ensure the reliability of the obtained results, calibration tests using materials with known calorific properties must be performed. This makes it possible to determine the instrumentation error coefficient of the experimental setup, taking into account the following factors: efficiency of heat transfer to the energy carrier;

heat transferred to the setup and its structural elements; heat consumed for preheating the air and sample; heat losses due to evaporation of the energy-absorbing liquid; other uncontrolled factors.

5. The research is conducted to experimentally determine the lower heating value (LHV) of organic plant-derived samples.

6. The research is also aimed at experimental comparison of operational combustion characteristics of fuels produced from mixtures of plant-based organic samples.

The design layout of the laboratory setup for experimental determination of the lower heating value and comparative characteristics of organic plant-derived samples is presented in *Figure 1*.

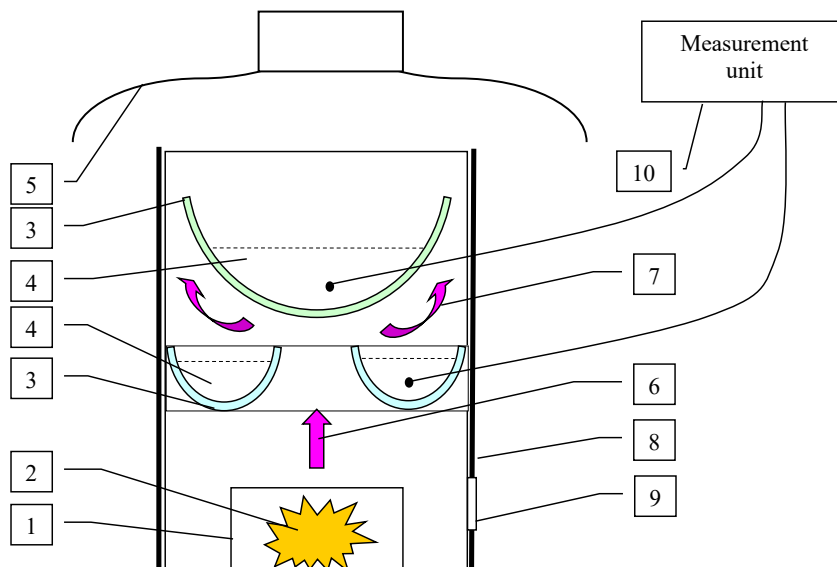


Fig. 1. Laboratory setup diagram

1 – heat-resistant container; 2 – test sample with ignition initiator; 3 – cascade-arranged cups; 4 – energy-accumulating liquid; 5 – exhaust hood; 6, 7 – flows of preheated air and combustion gases; 8 – housing of the laboratory setup; 9 – loading window; 10 – measurement unit.

The laboratory setup (*Fig. 1*) operates as follows. The test material sample (2) together with the ignition initiator is placed inside the container (1) made of heat-resistant material. The corresponding cups (3), arranged in a cascade configuration, are installed and filled with the energy-accumulating liquid (4) after determining its volume.

To ensure maximum efficiency of heat transfer, the thermal flow streams (6, 7) are directed around the cups, which are arranged according to a cascade pattern. To remove combustion products from the laboratory environment, the housing of the setup (8), made of thermo-insulating material, is placed under an exhaust hood (5).

Ignition of the sample with the initiator is performed through the loading window (9). The temperature rise of the energy-accumulating liquid is recorded using the measurement unit (10) [20], equipped with thermocouples, and the data are registered digitally with a time-based sampling frequency for further analytical processing.

Calibration procedure and measurement error determination.

The purpose of the calibration procedure is to determine the heat of combustion of the material used to

initiate ignition of the test sample, as well as to estimate the overall measurement error of the developed laboratory setup.

At the first stage of calibration research, the calorific value of the ignition material is experimentally determined under actual laboratory operating conditions. The following sequence of steps is performed:

1. The cups (3) (*Fig. 1*) are filled with the energy-accumulating liquid (4) in volumes V_{p1} and V_{p2} , depending on their number. The electronic measurement module with mechatronic system elements is activated, recording the temperature values measured by thermocouples in the following locations: ambient air temperature (T_{p1}); combustion gas temperature inside the exhaust hood (T_{p2}); temperature of the energy-accumulating liquid in each cup ($T_{n1}(t)$ and $T_{n2}(t)$). The ignition material – ethyl alcohol (96%) of predefined mass M_{st} – is placed inside the setup.

2. Through the loading window (9), the ignition material (96% ethanol) is ignited. The exhaust hood (5) is activated to evacuate combustion gases from the laboratory environment. The duration of the experiment is determined by the complete combustion of the sample.

3. Upon completion of combustion, the measurement unit is switched off. The obtained data are automatically

transmitted to the computing device and saved into the dataset. Subsequently, the ash residue (M_{st2}) and the remaining mass of the sample after combustion (M_{r2}) are measured using analytical scales.

4. To ensure reliable measurement accuracy, each experiment is repeated five times.

5. The specific calorific value of the ignition material is determined using the following formula:

$$Q_{st} = \frac{c \cdot \rho_p [V_{p1} \cdot (T_{p1n} - T_{p1i}) + V_{p2} \cdot (T_{p2n} - T_{p2i})]}{M_{st}}, \quad (3)$$

where Q_{st} is the specific heat of combustion of the ignition substance, J/kg;

c is the specific heat capacity, J/(kg·°C) (for water under ambient conditions, 4183 J/(kg·°C));

V_{p1} , V_{p2} are the volumes of the energy-accumulating liquid in each cup, m³;

ρ_p is the density of the energy-accumulating liquid under ambient conditions, kg/m³ (for water, 1000 kg/m³);

T_{pni} is the temperature of the energy-accumulating liquid at the end of the experiment, °C;

T_{pni} is the temperature of the energy-accumulating liquid at the beginning of the experiment, °C;

M_{st} is the mass of the combustible material used to initiate the combustion of the test sample, kg.

The overall coefficient of instrumental error in the measurement of the heat of combustion is determined by comparison with known reference values. For 96 % ethanol, the heat of combustion is 30 MJ/kg, according to the following formula:

$$k_{inst} = \frac{Q_{ststat}}{Q_{tabl}} \quad (4)$$

The determined coefficient of instrumental error must be taken into account when processing the results of absolute measurements.

To assess the energy efficiency of biomass production from energy crops, the author's methodology by Kalinchenko O. V. and Kulyk M. I. was applied. Statistical analysis of the obtained data was performed using established methods, considering the experiment replications.

Results and discussion

The dry plant-based raw material of each energy crop was analyzed using a prototype of the laboratory *biofuel analyzer*. The original laboratory setup was manufactured in accordance with established technical regulations (Fig. 2, Fig. 3).

Table 1

Data for calculating the heat of combustion of the ignition substance

Experiment	V_{p1} , m ³	V_{p2} , m ³	T_{p1i} , °C	T_{p2i} , °C	T_{p1n} , °C	T_{p2n} , °C	M_{st} , kg	q_p , kg/m ³	c , kJ/kg °C	Q_{st} , MJ/kg	Q_{ststat} , MJ/kg
1	0.0015	0.0015	22	22	33	27	0.0052	1000	4183	21,7	21.9
2	0.0015	0.0015	31	25	42	32	0.0051	1000	4183	21,8	
3	0.0015	0.0015	21	22	33	27	0.0053	1000	4183	21,8	
4	0.0015	0.0015	32	26	43	33	0.005	1000	4183	22,1	
5	0.0015	0.0015	31	25	42	32	0.0051	1000	4183	22,1	



Fig. 2. Laboratory setup (external view)

5 – exhaust hood; 8 – housing of the laboratory setup;
9 – loading window; 10 – measurement unit.

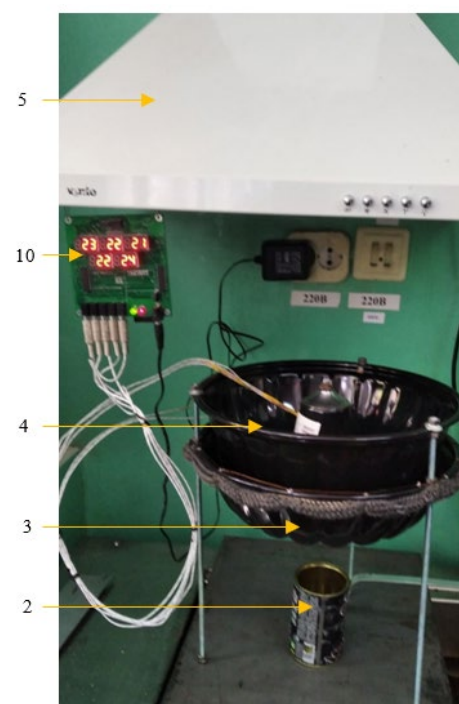


Fig. 3. Laboratory setup (without thermal casing)

2 – container for the test sample with ignition initiator;
3 – cascade-arranged cups; 4 – energy-accumulating liquid;
5 – exhaust hood; 10 – measurement unit.

The results of the calibration tests and the experimentally determined heat of combustion of the ignition initiator under laboratory conditions are presented in Table 1.

The coefficient of instrumental error is calculated using Equation (4), $k_{inst} = 21.9 / 30.0 = 0.73$.

Considering the obtained coefficient, the evaluation of parameters for the plant-based samples of the selected energy crops was carried out.

Based on the results of the laboratory studies, the ash content and the lower heating value (LHV) of all selected samples of energy crops were determined.

Ash content directly influences the operational performance of fuel and is regulated by international European and American standards. The obtained results indicate that the ash content values generally meet these requirements; however, further investigation under real production conditions is necessary.

Using the analysis of the experimental data, a methodology for determining the lower heating value of energy crops was proposed. Compared with widely known methods, the described equipment is original and suitable for implementation in laboratories focused on operational studies of biofuel under production conditions.

The developed methodology for determining energy indicators allows calculating fuel demand and cost when compiling thermal balances and assessing the operating characteristics of systems using plant-based fuel.

During the determination of the calorific value of plant raw materials from energy crops, the following results were obtained (Table 2), which were compared with the results obtained using the established laboratory method – the calorimetric bomb.

Table 2
Calorific value of plant-based raw materials, MJ/kg

Plant biomass	Laboratory setup	Calorimetric bomb	Deviation
Castor bean (<i>Ricinus communis</i>)	9,78	9,92	0,02
Sorghum (<i>Sorghum</i>)	17,97	17,94	-0,03
Switchgrass (<i>Panicum virgatum</i>)	14,71	14,72	0,01
Paulownia (<i>Paulownia</i>)	10,67	10,69	0,02
Virginia mallow (<i>Sida hermaphrodita</i>)	13,93	13,90	0,03
Sorrel hybrid (<i>Rumex patientia</i> × <i>Rumex tianschanicus</i>)	12,35	12,33	0,02
LSD _{0,05}	–	–	0,003

Conclusions

The study presents a generalization and proposes a new solution to a scientific problem, which consists in the development of a methodology and the implementation of experimental and comparative investigations to determine the relative calorific values of organic plant-derived samples using original equipment equipped with elements of mechatronic systems.

The research demonstrated that the calorific value measurements of plant biomass carried out using the developed laboratory setup with mechatronic measuring instruments are in agreement with the results obtained using a standard calorimetric bomb. Since the obtained data were statistically identical – as confirmed by their

significance level (LSD_{0,05} at $p < 0,05$) – this justifies the use of the original biofuel analyzer as a reliable tool for the objective determination of the energy characteristics of plant raw materials.

Under experimental conditions, the calorific value of six plant-based samples was determined as follows: Castor bean (*Ricinus communis*) – 9.78 MJ/kg; Sorghum (*Sorghum*) – 17.97 MJ/kg; Switchgrass (*Panicum virgatum*) – 14.71 MJ/kg; Paulownia (*Paulownia*) – 10.67 MJ/kg; Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*) – 13.93 MJ/kg; Sorrel hybrid (*Rumex patientia* × *Rumex tianschanicus*) – 12.35 MJ/kg.

Future research in the cultivation of bioenergy crops should be directed towards the economic and social justification of their use, including an assessment of the feasibility of employing non-food agricultural lands and areas of non-agricultural enterprises, in order to avoid competition with food production systems.

DECLARATIONS

Ethical Statement

Not applicable.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

None.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The authors declare that no artificial intelligence or AI-assisted technologies were used in the preparation of this manuscript.

References

- Gorb, O., Rebilas, R., Aranchiy, V., Yasnolob, I., Boiko, S., & Padalka, V. (2020). Strengthening competitiveness of the national economy by enhancing energy efficiency and diversifying energy supply sources in rural areas. *Journal of Environmental Management and Tourism*, 11 (5), 1114. [https://doi.org/10.14505/jemt.v11.5\(45\).09](https://doi.org/10.14505/jemt.v11.5(45).09)
- Cicea, C., Ciocoiu, C. N., & Marinescu, C. (2021). Exploring the research regarding energy-economic growth relationship. *Energies*, 14 (9), 2661. <https://doi.org/10.3390/en14092661>
- Giraudet, L.-G., & Missemer, A. (2023). The history of energy efficiency in economics: Breakpoints and regularities. *Energy Research & Social Science*, 97, 102973. <https://doi.org/10.1016/j.erss.2023.102973>
- Padalka, V., Gorbenko, O., Ivankova, O., Dudnyk, V., & Horiunov, B. (2025). Justification of the parameters of the active conical wood deformer. *Technology Audit and Production Reserves*, 3 (1(83)), 46–51. <https://doi.org/10.15587/2706-5448.2025.329722>
- Canuto, E., Mazza, D., & Novara, C. (2024). Projection of the airborne CO₂ concentration by land/ocean absorption dynamics and fossil-fuel reserve depletion. *Environmental Modeling & Assessment*, 29 (6), 1167–1187. <https://doi.org/10.1007/s10666-024-09985-7>
- Mercure, J.-F., & Salas, P. (2013). On the global economic potentials and marginal costs of non-renewable resources and the price of energy commodities. *Energy Policy*, 63, 469–483. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.08.040>

7. Badger, P. C. (2002). *Processing cost analysis for biomass feedstocks* (Report No. ORNL/TM-2002/199). Oak Ridge National Laboratory. <https://doi.org/10.2172/814666>
8. Avelin, A., Skvaril, J., Aulin, R., Odlare, M., & Dahlquist, E. (2014). Forest biomass for bioenergy production – Comparison of Different forest species. *Energy Procedia*, 61, 1820–1823. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.12.221>
9. Kamani, M. H., Eş, I., Lorenzo, J. M., Remize, F., Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Clark, J., & Mousavi Khaneghah, A. (2019). Advances in plant materials, food by-products, and algae conversion into biofuels: use of environmentally friendly technologies. *Green Chemistry*, 21 (12), 3213–3231. <https://doi.org/10.1039/c8gc03860k>
10. Gravalos, I., Xyradakis, P., Kateris, D., Gialamas, T., Bartzialis, D., & Giannoulis, K. (2016). An experimental determination of gross calorific value of different agroforestry species and bio-based industry residues. *Natural Resources*, 07 (01), 57–68. <https://doi.org/10.4236/nr.2016.71006>
11. Bušić, A., Mardetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., & Šantek, B. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 56 (3), 546–554. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>
12. Jain, S., & Kumar, S. (2024). A comprehensive review of bioethanol production from diverse feedstocks: Current advancements and economic perspectives. *Energy*, 296, 131130. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2024.131130>
13. Knight, B., & Westwood, A. (2005). World biomass review: biomass as a global power source [Abstract]. *Fuel and Energy Abstracts*, 46(4), 280. [https://doi.org/10.1016/s0140-6701\(05\)81938-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6701(05)81938-1)
14. Yan, Z., Li, G., & Wan, S. (2023). Oil crops: A potential source of biodiesel. *Engineering*, 29, 39–41. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.07.011>
15. Elgharbawy, A. S., Sadik, Wagih. A., Sadek, O. M., & Kasaby, M. A. (2021). A review on biodiesel feedstocks and production technologies. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 66 (1), 5098–5109. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072021000105098>
16. Abdul Hakim Shaah, M., Hossain, Md. S., Salem Allafi, F. A., Alsaedi, A., Ismail, N., Ab Kadir, M. O., & Ahmad, M. I. (2021). A review on non-edible oil as a potential feedstock for biodiesel: physicochemical properties and production technologies. *RSC Advances*, 11 (40), 25018–25037. <https://doi.org/10.1039/d1ra04311k>
17. McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*, 83 (1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00118-3](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00118-3)
18. Muir, J. P., Sanderson, M. A., Ocumpaugh, W. R., Jones, R. M., & Reed, R. L. (2001). Biomass production of ‘Alamo’ switchgrass in response to nitrogen, phosphorus, and row spacing. *Agronomy Journal*, 93(4), 896–901. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.934896x>
19. Ledda, L., Deligios, P. A., Farci, R., & Sulas, L. (2013). Biomass supply for energetic purposes from some *Cardueae* species grown in Mediterranean farming systems. *Industrial Crops and Products*, 47, 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.013>
20. Vogel, K. P., Brejda, J. J., Walters, D. T., & Buxton, D. R. (2002). Switchgrass biomass production in the Midwest USA: harvest and nitrogen management. *Agronomy Journal*, 94(3), 413–420. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.0413>

ORCID

- | | |
|---|---|
| V. Padalka  | https://orcid.org/0000-0002-4135-3318 |
| O. Gorbenco  | https://orcid.org/0000-0003-2473-0801 |
| M. Kulyk  | https://orcid.org/0000-0003-0394-5846 |
| M. Chumak  | https://orcid.org/0009-0005-4273-5130 |



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Heat engineering aspects of automatic control of the heat-moisture state of the heat carrier in shaft-type grain dryers

O. Ivanov✉

Article info

Correspondence Author

O. Ivanov

E-mail:

oleg.ivanov@pdau.edu.ua

Poltava State Agrarian
University,
Skovoroda Str., 1/3, Poltava,
36000, Ukraine

Citation: Ivanov, O. (2026). Heat engineering aspects of automatic control of the heat-moisture state of the heat carrier in shaft-type grain dryers. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 211–217. doi: 10.31210/spi2026.29.02.29

The article considers the heat engineering aspects of automatic regulation of the heat-moisture state of the heat carrier in shaft-type grain dryers. The purpose of the study is to substantiate the features of formation and stabilization of the temperature and humidity parameters of the heat carrier under conditions of automated control of the grain drying process. The study is based on methods of analysis and generalization of scientific and technical literature, system analysis, heat engineering analysis of heat and mass transfer processes, as well as mathematical modeling of dynamic control processes in grain drying systems. The physical model of the grain drying process in shaft-type grain dryers was analyzed, and the main factors affecting the formation of the heat-moisture state of the heat carrier were identified. It was established that the efficiency of the drying process largely depends on the stability of the temperature and humidity parameters of the heat carrier, the initial grain moisture content, the airflow rate, and the thermal inertia of the drying system. Based on the heat balance equation and mathematical models of moisture removal from grain material, the relationship between the heat carrier parameters and the intensity of heat and mass transfer in the grain layer was substantiated. A dynamic model of the drying system was proposed, taking into account the inertia of thermal processes and the delay between the control action and the response of the drying chamber. The study substantiates the expediency of using a closed-loop automatic control system based on PID regulation for simultaneous stabilization of the temperature and humidity parameters of the heat carrier. The proposed approach provides continuous monitoring of the heat carrier parameters and adjustment of the operating modes of the heat generator and ventilation system according to changes in the thermal state of the grain mass. The constructed graphical dependences in Cartesian coordinate systems showed that automatic regulation makes it possible to reduce fluctuations in the heat carrier temperature, improve the stability of drying modes, decrease unnecessary heat losses, and increase the energy efficiency of the drying process. It was established that multiparameter control of the heat-moisture state of the heat carrier contributes to more uniform moisture removal from grain material and reduces the risk of local overheating of grain. The practical significance of the obtained results lies in the possibility of using the proposed approaches in the design and improvement of automated control systems for shaft-type grain dryers in order to increase the stability and energy efficiency of grain drying technologies.

Keywords: grain drying, shaft-type grain dryer, heat carrier, heat-moisture state, automatic control, PID regulation, heat and mass transfer.

Теплотехнічні аспекти автоматичного регулювання тепловологісного стану теплоносія у зерносушарках шахтного типу

О. М. ІВАНОВ

Полтавський державний
аграрний університет,
м. Полтава, Україна

У статті розглянуто теплотехнічні аспекти автоматичного регулювання тепловологісного стану теплоносія у зерносушарках шахтного типу. Метою дослідження є обґрунтування особливостей формування та стабілізації температурно-вологісних параметрів теплоносія в умовах автоматизованого керування процесом сушіння зерна. Дослідження базується на методах аналізу та узагальнення науково-технічної літератури, системного аналізу, теплотехнічного аналізу процесів тепло- і масообміну, а також математичного моделювання динамічних процесів керування у зерносушарках. Проаналізовано фізичну модель процесу сушіння зерна у шахтних зерносушарках та визначено основні фактори, що впливають на формування тепловологісного стану сушильного агента. Установлено, що ефективність процесу сушіння значною мірою залежить від стабільності температурно-вологісних параметрів теплоносія, початкової вологості зерна, витрати повітряного потоку та теплової інерційності сушильної системи. На основі рівняння теплового балансу та математичних моделей видалення вологи із зернового матеріалу обґрунтовано взаємозв'язок між параметрами теплоносія та інтенсивністю тепло- і масообміну у зерновому шарі. Запропоновано динамічну модель сушильної системи, яка враховує інерційність теплових процесів і затримку між керуючим впливом та реакцією сушильної камери. У роботі обґрунтовано доцільність використання системи автоматичного керування із замкненим контуром на основі PID-регулювання для одночасної стабілізації температурних і вологісних параметрів теплоносія. Запропонований підхід забезпечує безперервний моніторинг параметрів сушильного середовища та коригування режимів роботи теплогенератора і вентиляційної системи відповідно до зміни теплового стану зернової маси. Побудовані графічні залежності у декартових системах координат показали, що автоматичне регулювання дозволяє зменшити коливання температури теплоносія, підвищити стабільність режимів сушіння, знизити непродуктивні теплові втрати та підвищити енергоефективність процесу сушіння. Установлено, що багатопараметричне регулювання тепловологісного стану теплоносія сприяє більш рівномірному видаленню вологи із зернового матеріалу та зменшує ризик локального перегріву зерна. Практичне значення отриманих результатів полягає у можливості використання запропонованих підходів під час проектування та вдосконалення автоматизованих систем керування зерносушарками шахтного типу з метою підвищення стабільності та енергоефективності технологій сушіння зерна.

Ключові слова: сушіння зерна, зерносушарка шахтного типу, теплоносії, тепловологісний стан, автоматичне регулювання, PID-регулювання, тепло- і масообмін.



Бібліографічний опис для цитування: Іванов О. М. Теплотехнічні аспекти автоматичного регулювання тепловологісного стану теплоносія у зерносушарках шахтного типу. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 211–217.

Introduction

Grain drying is one of the most energy-intensive technological processes in the post-harvest treatment of agricultural products, as it requires significant heat consumption to ensure the required moisture content of grain material. The efficiency of grain drying units is largely determined by the stability of the heat carrier parameters, particularly its temperature and humidity, which directly affect the intensity of heat and mass transfer, drying duration, energy consumption, and the quality of the final product [1, 2]. Violation of the heat-moisture drying regime may lead to local overheating of grain, non-uniform moisture removal, increased specific energy consumption, and deterioration of the seed and technological properties of grain products [3].

Modern studies pay considerable attention to improving the energy efficiency of grain drying units through the optimization of heat engineering regimes and the implementation of automated drying process control systems [4]. One of the promising approaches is the automatic regulation of heat carrier parameters, which makes it possible to stabilize the temperature and humidity state of the drying medium depending on changes in technological and environmental factors [5]. Contemporary research addresses mathematical modeling of heat and mass transfer processes during grain drying, the application of PID controllers, intelligent control systems, and digital monitoring of heat carrier parameters [6, 7]. Considerable attention is also devoted to the optimization of grain dryer energy consumption, improvement of heat carrier supply systems, and the application of modern sensor technologies for process parameter control [8, 9].

Despite the large number of scientific studies devoted to the automation of grain drying processes, the heat engineering aspects of automatic regulation of the heat-moisture state of the heat carrier in shaft-type grain dryers remain insufficiently studied. In particular, insufficient attention has been paid to the relationship between heat carrier parameters, the thermal inertia of the drying system, and the efficiency of automated control of the drying process [10]. In addition, modern approaches to the stabilization of temperature and humidity parameters of the heat carrier from the standpoint of energy efficiency and uniform grain drying require further generalization.

The relevance of the study is determined by the need to improve the efficiency of heat utilization in grain drying systems, reduce energy consumption, and ensure stable grain drying regimes through the improvement of automatic control systems for heat carrier parameters.

The aim of the study

The purpose of the study is to substantiate the heat engineering features of automatic regulation of the heat-moisture state of the heat carrier in shaft-type grain dryers.

To achieve this purpose, it is necessary to analyze the heat engineering features of the grain drying process in shaft-type grain dryers. Particular attention should be paid to the factors influencing the formation of the heat-

moisture state of the heat carrier and the principles of its automatic control. In addition, it is necessary to substantiate the relationship between the heat carrier parameters, drying process stability, and the energy efficiency of grain dryers.

Materials and methods

The object of the study is the process of automatic regulation of the heat-moisture state of the heat carrier in shaft-type grain dryers. The subject of the study is the heat engineering regularities of the formation and stabilization of the temperature and humidity parameters of the heat carrier under conditions of automated control of the grain drying process.

The study employed a set of general scientific and specialized methods, including analysis and generalization of scientific and technical literature, system analysis, structural and functional analysis, and methods of heat engineering analysis of heat and mass transfer processes in grain drying units. The theoretical basis of the study is formed by the principles of heat engineering, the theory of heat and mass transfer, and the fundamentals of automatic regulation of technological processes.

The analysis of heat engineering processes in shaft-type grain dryers was carried out taking into account the influence of the temperature, humidity, and flow rate of the heat carrier on the intensity of heat and mass transfer processes, the stability of drying regimes, and the energy efficiency of the drying unit. Particular attention was paid to the investigation of the relationship between the heat carrier parameters and the conditions of formation of the heat-moisture state of the drying medium.

During the study of automatic regulation principles, the operational features of closed-loop control systems were taken into account, in which stabilization of heat carrier parameters is ensured through the use of temperature and humidity sensors, controllers, and actuating mechanisms. The analysis was performed from the standpoint of the influence of automated control on the stability of the heat-moisture state of the heat carrier, the uniformity of grain drying, and the reduction of energy consumption in shaft-type grain dryers.

Results and discussion

The grain drying process in shaft-type grain dryers represents a complex heat and mass transfer system in which heat is transferred from the heat carrier to the grain mass simultaneously with moisture evaporation from the grain. The efficiency of the drying process is determined by the heat-moisture state of the heat carrier, characterized by its temperature, humidity, and airflow velocity.

During the passage of the heat carrier through the grain layer, its temperature gradually decreases, while its humidity increases due to the absorption of evaporated moisture. The intensity of heat and mass transfer depends on the initial grain moisture content, the temperature difference between the grain mass and the heat carrier, the airflow rate, and the residence time of grain within the drying shaft.

A characteristic feature of shaft-type grain dryers is the non-uniform distribution of temperature and humidity parameters along the height of the drying shaft, as well as the significant thermal inertia of the system. This determines the dynamic nature of the formation of the heat-moisture state of the heat carrier and necessitates its stabilization during the grain drying process.

Further analysis of the drying process requires a mathematical description of the relationship between the heat engineering parameters of the grain drying unit and the heat-moisture state of the heat carrier. To evaluate the energy state of the drying system, the heat balance equation was used:

$$Q_{in} = Q_{gr} + Q_{ev} + Q_{loss}, \quad (1)$$

where Q_{in} is the heat supplied by the heat carrier;
 Q_{gr} is the heat consumed for heating the grain mass;
 Q_{ev} is the heat used for moisture evaporation;
 Q_{loss} represents heat losses to the environment.

The presented relationship shows that the efficiency of heat utilization in a grain dryer is determined by the ratio between useful heat consumption and thermal losses of the system. Changes in the temperature or humidity of the heat carrier alter the intensity of heat and mass transfer, which directly affects the energy efficiency of the drying process.

The intensity of moisture removal from the grain mass can be described by the following relationship:

$$\frac{dW}{d\tau} = -k(W - W_e), \quad (2)$$

where W is the current grain moisture content;
 W_e is the equilibrium moisture content;
 k is the drying coefficient;
 τ is the drying time.

According to the presented model, the drying rate is determined by the difference between the current and equilibrium moisture content of the grain, as well as by the conditions of heat and mass transfer within the drying zone. An increase in the heat carrier temperature intensifies moisture evaporation; however, excessive temperature elevation may lead to non-uniform drying and local overheating of the grain mass.

To evaluate the dynamics of changes in the thermal state of the system, a first-order inertial model was used:

$$T \frac{dy(t)}{dt} + y(t) = Ku(t), \quad (3)$$

where T is the system time constant;
 $y(t)$ is the controlled parameter;
 $u(t)$ is the control action;
 K is the system gain coefficient.

The presented relationship characterizes the inertial nature of changes in the heat-moisture state of the heat carrier in shaft-type grain dryers and makes it possible to take into account the time delay between changes in the operating mode of the heat generator and the response of the drying system.

To ensure the stability of the heat-moisture state of the heat carrier, a shaft-type grain dryer should be considered

as a multiparameter automatic control object with a closed-loop regulation system. In such a system, the main controlled parameters are the temperature and humidity of the heat carrier, while the control actions are the intensity of airflow heating and the performance of the ventilation system.

Structurally, the automatic control system includes temperature and humidity sensors, a signal processing unit, a controller, a heat generator, and actuating mechanisms of the heat carrier supply system. During operation, the sensors continuously record the current parameters of the drying medium, after which the signal is transmitted to the controller, where the deviation of the actual parameters from the specified values is determined. Based on the obtained error, a control signal is generated to change the operating mode of the heat generator or the ventilation system.

The mathematical description of the automatic control process can be represented by the PID controller equation:

$$u(t) = K_p e(t) + K_i \int e(t) dt + K_d \frac{de(t)}{dt}, \quad (4)$$

where $u(t)$ is the control signal;
 $e(t)$ is the control error;

K_p , K_i and K_d are the coefficients of the proportional, integral, and derivative components of the controller, respectively.

The proportional component ensures a rapid system response to changes in the heat carrier parameters, the integral component eliminates the steady-state control error, while the derivative component compensates for rapid changes in the drying medium parameters and reduces overshoot. The combined application of these components makes it possible to improve the stability of the temperature-humidity drying regime.

The analysis established that, for shaft-type grain dryers, the most significant factor affecting the quality of regulation is the thermal inertia of the system. The considerable volume of the grain mass and the duration of its residence within the drying shaft cause a time delay between changes in the heat carrier parameters and the response of the system. Under such conditions, the use of only proportional regulation may lead to fluctuations in the temperature and humidity parameters and instability of the drying regime.

Therefore, it is advisable to apply combined regulation of the temperature and humidity of the heat carrier, taking into account the current state of the grain mass and environmental conditions. Such an approach makes it possible to increase the accuracy of maintaining the heat-moisture state of the heat carrier and to ensure a more stable grain drying process.

Further analysis of the effectiveness of the proposed automatic regulation approach requires evaluation of the relationship between the heat carrier parameters and the main characteristics of the drying process. For this purpose, the dependences characterizing the influence of the temperature regime, the dynamics of changes in grain moisture content, and the inertial properties of the system on the operational stability of the shaft-type grain dryer were analyzed.

According to the heat balance equation, an increase in the temperature difference between the inlet and outlet heat carrier is accompanied by an increase in the heat flow transferred to the grain mass. The graphical dependence of the heat flow on the temperature difference has a nearly linear character, indicating a proportional increase in heat transfer intensity with increasing heat carrier temperature (*Fig. 1*).

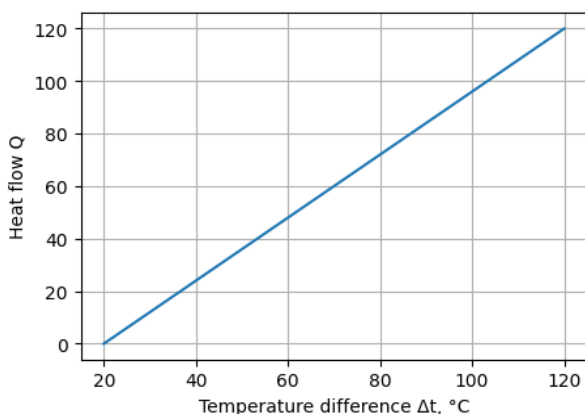


Fig. 1. Dependence of heat flow on the temperature difference of the heat carrier

At the same time, excessive increase in the heat carrier temperature is accompanied by an increase in unnecessary heat losses and the risk of local overheating of the grain mass, especially in the upper zones of the drying shaft where the initial grain moisture content is the highest. This confirms the necessity of maintaining a rational drying temperature regime.

The intensity of the drying process is determined by the rate of moisture removal from the grain mass. Analysis of drying kinetics showed that the change in grain moisture content over time has an exponential character (*Fig. 2*).

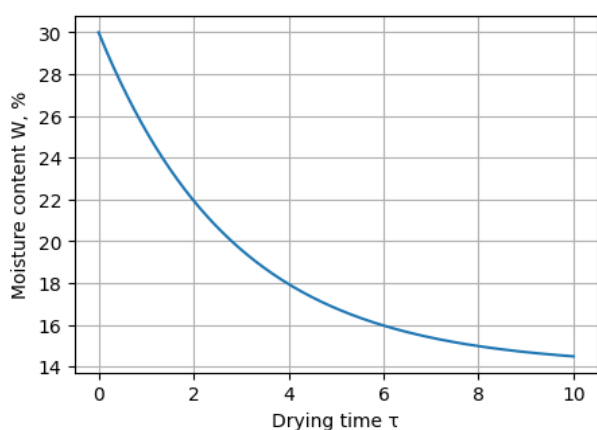


Fig. 2. Kinetics of grain moisture content change during the drying process

The highest moisture removal rate is observed at the initial stage of the process, when the difference between the current and equilibrium grain moisture content is

maximal. Subsequently, the drying intensity gradually decreases due to the reduction of mass transfer between the grain and the heat carrier.

The obtained dependence indicates the expediency of changing the heat carrier supply parameters depending on the stage of the drying process. Maintaining a constant heat carrier temperature throughout all drying stages may result in excessive heat consumption and non-uniform moisture removal from the grain mass.

The conducted analysis also showed that the drying intensity depends nonlinearly on the heat carrier temperature. As the temperature increases, the rate of moisture evaporation rises; however, after reaching a certain temperature level, the increase in drying intensity gradually decreases (*Fig. 3*). This is explained by the reduction in the efficiency of heat and mass transfer and the increase in heat losses under excessive heating of the airflow.

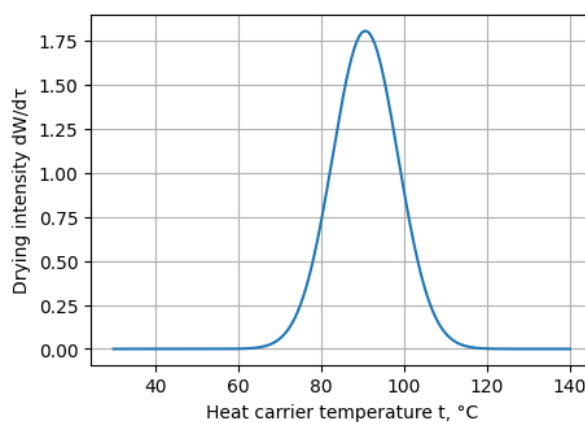


Fig. 3. Influence of heat carrier temperature on grain drying intensity

The presented dependence makes it possible to determine the rational operating temperature range of the grain dryer, within which the most efficient heat utilization is ensured without deterioration of grain product quality.

The dynamic properties of the automatic control system are of particular importance for the stability of the drying process. Analysis of the transient process showed that changes in the operating mode of the heat generator do not result in instantaneous stabilization of the heat carrier parameters, since the system is characterized by considerable thermal inertia (*Fig. 4*). As a consequence, a time delay occurs between the control action and the response of the drying system.

As the system inertia increases, the risk of fluctuations in the temperature and humidity parameters of the heat carrier and overshoot also increases. The application of PID regulation makes it possible to reduce the fluctuation amplitude and shorten the time required for the system to reach a steady-state operating mode.

Improving the stability of the temperature regime directly affects the energy efficiency of the drying process. Analysis of the dependence of specific energy consumption on the amplitude of heat carrier temperature

fluctuations showed that an increase in temperature regime instability leads to higher unnecessary heat losses (Fig. 5).

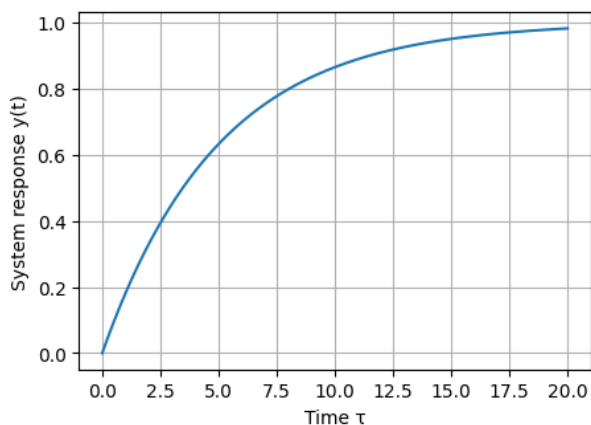


Fig. 4. Transient response of the automatic heat carrier temperature regulation system

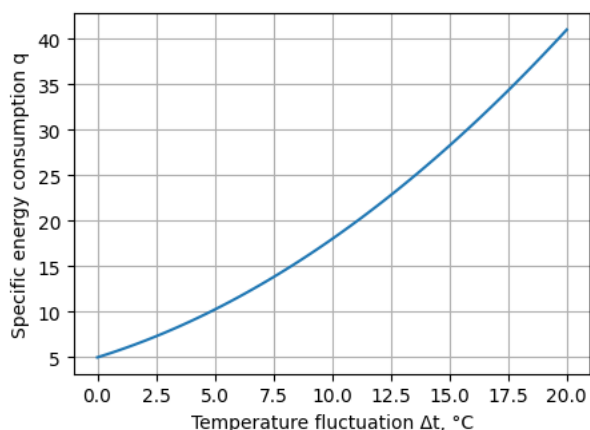


Fig. 5. Influence of heat carrier temperature fluctuations on the specific energy consumption of the grain dryer

The obtained graphical dependences confirm that the efficiency of the drying process in shaft-type grain dryers is determined by the complex interaction of the temperature and humidity parameters of the heat carrier, as well as by the dynamic characteristics of the automatic control system. This indicates the expediency of using multiparameter control systems capable of stabilizing the heat-moisture state of the heat carrier according to changing drying process conditions.

The conducted study confirms that modern approaches to the automation of grain drying processes are focused on integrated regulation of drying medium parameters with consideration of the dynamics of heat and mass transfer within the grain layer. Unlike traditional systems, in which regulation is performed mainly according to the heat carrier temperature, modern grain drying units increasingly apply multiparameter control with simultaneous consideration of temperature, humidity, and airflow rate [11, 12]. This makes it possible to improve the stability of the drying process and reduce energy consumption through more accurate coordination

of the operating modes of the heat generator and the ventilation system.

The results of the conducted analysis are consistent with contemporary studies devoted to improving the energy efficiency of grain drying units through stabilization of heat carrier parameters and optimization of drying regimes [13]. In modern grain drying systems, particular attention is paid to maintaining stable temperature and humidity parameters of the drying medium, since their fluctuations lead to increased heat losses and deterioration of grain drying uniformity [14].

The conducted study confirms that, for shaft-type grain dryers, one of the most significant factors affecting the efficiency of automatic regulation is the thermal inertia of the system. Under conditions of considerable drying process inertia, the use of only proportional regulation does not provide the required stability of the temperature-humidity regime, which is consistent with the results of studies in the field of heat engineering analysis of drying systems [15, 16].

In modern approaches to the automation of drying processes, multiparameter control systems capable of simultaneously considering temperature, humidity, and heat carrier flow rate are becoming increasingly widespread [17]. The use of sensor-based monitoring systems for drying medium parameters creates the possibility for prompt correction of the operating modes of the heat generator and ventilation system according to changes in the heat engineering state of the grain mass [18].

The obtained results also confirm the prospects of using adaptive control algorithms for shaft-type grain dryers. Unlike classical PID regulation, adaptive systems make it possible to account for changes in grain moisture content and environmental parameters in real time, thereby improving drying energy efficiency and reducing unnecessary heat losses [19].

Thus, the proposed approach to automatic regulation of the heat-moisture state of the heat carrier corresponds to current trends in the development of energy-efficient grain drying technologies and can be applied in improving automated control systems for shaft-type grain dryers. A promising direction for further development is the integration of mathematical modeling of heat and mass transfer processes with real-time monitoring systems of drying medium parameters to ensure more stable grain drying regimes [20].

Conclusions

As a result of the conducted study, it was established that the efficiency of the grain drying process in shaft-type grain dryers is largely determined by the stability of the heat-moisture state of the heat carrier, which is characterized by the temperature and humidity parameters of the drying medium. It was determined that the process of formation of the heat-moisture state of the heat carrier has a dynamic character and depends on the interaction of heat engineering and technological factors, including the initial moisture content of the grain mass, the airflow rate, and the operating mode of the heat generator.

Based on the analysis of mathematical models, the influence of the thermal inertia of the drying system on the stability of drying regimes was substantiated, and the regularities of changes in temperature and humidity parameters during heat and mass transfer processes were established.

The expediency of using multiparameter automatic regulation of the temperature and humidity of the heat carrier to improve the accuracy of maintaining drying medium parameters and reduce the amplitude of their fluctuations was proven. Analysis of the graphical dependences showed that stabilization of the temperature-humidity regime contributes to increased drying intensity, reduction of unnecessary heat losses, and improvement of the uniformity of moisture removal from the grain mass. It was established that the use of PID regulation ensures a reduction in system stabilization time and improves the operational stability of the grain dryer under conditions of variable heat engineering load.

The scientific novelty of the study lies in substantiating the relationship between the heat-moisture state of the heat carrier, the dynamic characteristics of the drying system, and the efficiency of automatic regulation of the grain drying process in shaft-type grain dryers.

The practical significance of the obtained results lies in the possibility of applying the proposed approaches for improving automated control systems of grain drying units in order to increase the energy efficiency and stability of technological drying regimes.

Prospects for further research. A promising direction for further research is the development of adaptive automatic control systems for the heat-moisture state of the heat carrier, taking into account changes in grain mass parameters and environmental conditions in real time. It is advisable to conduct studies aimed at integrating digital monitoring systems, intelligent control algorithms, and mathematical modeling of heat and mass transfer processes in shaft-type grain dryers. Particular attention should be paid to investigating the possibilities of applying predictive control algorithms to improve the energy efficiency of the grain drying process and reduce unnecessary heat losses.

DECLARATIONS

Ethical Statement

Not applicable.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The author declares no conflict of interest.

Acknowledgements

None.

Declaration of AI and AI-assisted technologies

The author declares that no artificial intelligence or AI-assisted technologies were used in the preparation of this manuscript.

References

1. Yu, P., Zhu, W., Shen, C., Qiao, Y., Zhang, W., Zhu, Y., Gong, J., & Cai, J. (2025). Current status of grain drying technology and equipment development: A review. *Foods*, 14(14), 2426. <https://doi.org/10.3390/foods14142426>
2. Jimoh, K. A., Hashim, N., Shamsudin, R., Man, H. C., Jahari, M., & Onwude, D. I. (2023). Recent advances in the drying process of grains. *Food Engineering Reviews*, 15(3), 548–576. <https://doi.org/10.1007/s12393-023-09333-7>
3. Baidhe, E., & Clementson, C. L. (2024). A review of the application of modeling and simulation to drying systems for improved grain and seed quality. *Computers and Electronics in Agriculture*, 222, 109094. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2024.109094>
4. Su, Y., Zhang, M., & Mujumdar, A. S. (2014). Recent developments in smart drying technology. *Drying Technology*, 33(3), 260–276. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.985382>
5. Najjar, Y., & Irbai, A. (2019). Heat and mass transfer analysis of a grain dryer. *INMATEH – Agricultural Engineering*, 58(2), 231–238.
6. Mondal, Md. H. T., & Sarker, Md. S. H. (2024). Comprehensive energy analysis and environmental sustainability of industrial grain drying. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 199, 114442. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2024.114442>
7. Zhang, Y., Fang, Z., Li, C., & Li, C. (2023). Deep-learning-based model predictive control of an industrial-scale multistate counter-flow paddy drying process. *Foods*, 13(1), 43. <https://doi.org/10.3390/foods13010043>
8. Chakravartula, S. S. N., Bandiera, A., Nardella, M., Bedini, G., Ibba, P., Massantini, R., & Moschetti, R. (2023). Computer vision-based smart monitoring and control system for food drying: A study on carrot slices. *Computers and Electronics in Agriculture*, 206, 107654. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2023.107654>
9. Kang, C., Zhang, G., Zhang, Q., Mu, G., Guo, H., Yuan, T., Li, R., Li, X., & Zhao, C. (2024). Control of multi-energy drying system: Optimal weighted combination prediction of moisture content and fuzzy compensation of wind speed. *Thermal Science and Engineering Progress*, 50, 102503. <https://doi.org/10.1016/j.tsep.2024.102503>
10. Sitompul, J. P., Istadi, & Widiasa, I. N. (2001). Modeling and simulation of deep-bed grain dryers. *Drying Technology*, 19(2), 269–280. <https://doi.org/10.1081/drt-1001029>
11. Beigi, M., Tohidi, M., & Torki-Harchegani, M. (2017). Exergetic analysis of deep-bed drying of rough rice in a convective dryer. *Energy*, 140, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.08.100>
12. Chang, K., Li, J., Jin, Y., & Liu, C. (2024). Development of grain dryer control technology from the perspective of low carbon and intelligentization. *Applied Sciences*, 14(22), 10587. <https://doi.org/10.3390/app142210587>
13. Venkateswarlu, K., & Reddy, S. V. K. (2024). Recent trends on energy-efficient solar dryers for food and agricultural products drying: a review. *Waste Disposal & Sustainable Energy*, 6(3), 335–353. <https://doi.org/10.1007/s42768-024-00193-3>
14. Shamshiri, R. R., Bojic, I., van Henten, E., Balasundram, S. K., Dworak, V., Sultan, M., & Weltzien, C. (2020). Model-based evaluation of greenhouse microclimate using IoT-Sensor data fusion for energy efficient crop production. *Journal of Cleaner Production*, 263, 121303. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121303>
15. Sorochinsky, V. F., & Dogadin, A. L. (2019). Assessing a dryer state using the parameters of a spent drying agent. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 341(1), 12118. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/341/1/012118>
16. Okunola, A., Adekanye, T., & Idahosa, E. (2021). Energy and exergy analyses of okra drying process in a forced convection cabinet dryer. *Research in Agricultural Engineering*, 67(1), 8–16. <https://doi.org/10.17221/48/2020-rae>
17. Thoben, K.-D., Wiesner, S., Wuest, T., & . (2017). “Industrie 4.0” and smart manufacturing – a review of research issues and application examples. *International Journal of Automation Technology*, 11(1), 4–16. <https://doi.org/10.20965/ijat.2017.p0004>

18. Hiendro, A., Syaifurrahman, S., Wigyariato, F. T. P., & Husin, F. (2025). Real-time paddy grain drying and monitoring system using long range-internet of things. *International Journal of Electrical and Computer Engineering (IJECE)*, 15(1), 448. <https://doi.org/10.11591/ijece.v15i1.pp448-454>
19. Defraeye, T. (2014). Advanced computational modelling for drying processes – A review. *Applied Energy*, 131, 323–344. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.06.027>
20. Lewis, M. A., & Trabelsi, S. (2021). Modeling heat and mass transfer within an eighth-scale grain drying system. 2021 ASABE Annual International Virtual Meeting, July 12-16, 2021. <https://doi.org/10.13031/aim.202101181>

ORCID

O. Ivanov 

<https://orcid.org/0000-0002-1761-9913>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Tuning of PID controller for tractor power take-off shaft rotational speed using particle swarm optimization method

V. Makarets  | M. Ikalchik | V. Khropost | A. Kushnirenko

Article info

Correspondence Author

V. Makarets

E-mail:

walera10100@gmail.com

Separated Subdivision of the
National University of Life
and Environmental Sciences
of Ukraine "Nizhyn
Agrotechnical Institute",
10 Shevchenka Str., Nizhyn,
16600, Ukraine

Citation: Makarets, V., Ikalchik, M., Khropost, V., & Kushnirenko, A. (2026). Tuning of PID controller for tractor power take-off shaft rotational speed using particle swarm optimization method. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 218–224. doi: 10.31210/spi2026.29.02.30

The paper investigates the application of the Particle Swarm Optimization algorithm for automatic tuning of the PID controller coefficients for tractor power take-off shaft rotational speed control. A generalized mathematical model of the system with parameters typical for medium-class tractors was developed, with engine gain $K_e = 50 \text{ N}\cdot\text{m}/\text{unit}$, engine time constant $T_e = 0.3 \text{ s}$, reduced moment of inertia $J = 2.5 \text{ kg}\cdot\text{m}^2$, viscous friction coefficient $b = 0.8 \text{ N}\cdot\text{m}\cdot\text{s}/\text{rad}$, PTO gear ratio $i = 3.5$ and transmission efficiency $\eta = 0.92$. Two approaches to automatic PID controller tuning were investigated: the Ziegler-Nichols method and the Particle Swarm Optimization method, the latter running a swarm of 30 particles over 80 iterations and converging after about 20. The Integral of Time-weighted Absolute Error (ITAE) was selected as the objective function for the particle swarm optimization. Unlike other integral criteria, the ITAE criterion, due to the incorporation of the time parameter, penalizes errors that persist over extended periods. This corresponds to the specifics of PTO control, where a short-term drop in rotational speed during a sudden load change is inevitable and acceptable, whereas prolonged oscillations in rotational speed lead to uneven processing, equipment wear, and excessive fuel consumption. The stability of the closed-loop system was proven using the Routh-Hurwitz criterion with a complete derivation of the characteristic polynomial, from which an explicit upper bound on the integral gain was obtained; both tunings satisfy the criterion, yet the determinants of the optimized controller exceed those of the Ziegler-Nichols tuning by several orders of magnitude ($\Delta z = 42\,273$ against 102.6). Robustness analysis was performed using the statistical Monte Carlo method under simultaneous $\pm 30\%$ variation of the plant parameters (J, b, K_e, T_e) across 100 realizations. The results showed that the PSO-optimized controller ($K_p = 3.63, K_i = 15.00, K_d = 0.25$) provides significantly lower overshoot (12.4 % against 97.1 %) and a substantially larger phase margin (79.0° against 33.8°) compared to the Ziegler-Nichols method, cuts the rise time from 0.248 s to 0.029 s at the reference speed of 540 rpm and the ITAE from 16.06 to 0.177, and maintains stability across all realizations of the Monte Carlo robustness analysis.

Keywords: PID controller, particle swarm optimization, power take-off, tractor, Hurwitz criterion, stability, robustness.

Налаштування ПІД-регулятора частоти обертання вала відбору потужності трактора за допомогою методу рою часток

В. В. Макарець | М. І. Ікальчик | В. І. Хропост | А. Г. Кушніренко

Відокремлений підрозділ
Національного
університету біоресурсів і
природокористування
України «Ніжинський
агротехнічний інститут»,
м. Ніжин, Україна

У роботі досліджено застосування алгоритму оптимізації роєм часток для автоматичного налаштування коефіцієнтів ПІД-регулятора частоти обертання вала відбору потужності трактора. Побудовано узагальнену математичну модель системи з параметрами, характерними для тракторів середнього тягового класу: коефіцієнт підсилення двигуна $K_e = 50 \text{ Н}\cdot\text{м}/\text{од.}$, стала часу двигуна $T_e = 0,3 \text{ с}$, зведений момент інерції $J = 2,5 \text{ кг}\cdot\text{м}^2$, коефіцієнт в'язкого тертя $b = 0,8 \text{ Н}\cdot\text{м}\cdot\text{с}/\text{рад}$, передавальне число редуктора $i = 3,5$ та коефіцієнт корисної дії трансмісії $\eta = 0,92$. Досліджено два підходи до автоматичного налаштування ПІД-регулятора: метод Зіглера-Нікольса та метод оптимізації роєм часток, з такими параметрами 30 часток протягом 80 ітерацій і збігався приблизно за 20. Як цільову функцію для оптимізації роєм часток обрано інтегральну абсолютну похибку, зважену за часом. На відміну від інших інтегральних критеріїв, цей критерій завдяки врахуванню параметру часу штрафувє похибки, що зберігаються тривалий час. Це відповідає специфіці задачі керування валом відбору потужності, де короточасний провал обертів за різкої зміни навантаження є неминучим і допустимим, тоді як тривалі коливання частоти обертання призводять до нерівномірної обробки, зносу обладнання та перевитрати палива. Стійкість замкненої системи доведено за критерієм Рауса-Гурвіца з повним виведенням характеристичного полінома, з якого отримано явне обмеження на інтегральний коефіцієнт; обидва варіанти налаштування задовольняють критерій, проте визначники оптимізованого регулятора на кілька порядків перевищують відповідні значення для методу Зіглера-Нікольса ($\Delta z = 42\,273$ проти 102.6). Аналіз робастності виконано статистичним методом Монте-Карло за одночасної варіації параметрів об'єкта (J, b, K_e, T_e) у межах $\pm 30\%$ на 100 реалізаціях. Результати показали, що оптимізований роєм часток регулятор ($K_p = 3,63; K_i = 15,00; K_d = 0,25$) забезпечує значно менше перерегулювання (12,4 % проти 97,1 %) та суттєво більший запас за фазою ($79,0^\circ$ проти $33,8^\circ$) порівняно з методом Зіглера-Нікольса, скорочує час наростання з 0,248 с до 0,029 с за заданої частоти обертання 540 об/хв і значення інтегральної зваженої похибки з 16,06 до 0,177, а також зберігає стійкість за всіх реалізацій аналізу робастності методом Монте-Карло.

Ключові слова: ПІД-регулятор, оптимізація роєм частинок, вал відбору потужності, трактор, критерій Гурвіца, стійкість, робастність.



Бібліографічний опис для цитування: Макарець В. В., Ікальчик М. І., Хропост В. І., Кушніренко А. Г. Налаштування ПІД-регулятора частоти обертання вала відбору потужності трактора за допомогою методу рою часток. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 218–224.

Вступ

Вал відбору потужності (ВВП) є одним із ключових елементів силової передачі сучасного сільськогосподарського трактора, що забезпечує передачу крутного моменту від двигуна до активних робочих органів навісного обладнання – фрез, косарок, подрібнювачів, кормозбиральних агрегатів. Стандартні частоти обертання ВВП становлять 540 або 1000 об/хв відповідно до стандарту ISO 500 [1]. Під час роботи у польових умовах навантаження на ВВП змінюється стохастично внаслідок зміни густоти рослинного покриття, коливань щільності ґрунту або потрапляння сторонніх предметів у робочі органи знаряддя, що призводить до коливань частоти обертання, нерівномірності обробки, підвищеного зношування обладнання та перевитрати палива [2].

Проблема стабілізації частоти обертання двигуна та вала відбору потужності (ВВП) трактора має тривалу історію й зазвичай вирішується за допомогою механічного відцентрового регулятора, який автоматично коригує подачу палива завдяки балансу відцентрової сили важків і сили пружини [3]. Однак механічний регулятор має обмежену точність, не дає змоги оптимізувати якість перехідних процесів і не забезпечує гнучкого налаштування під різні умови експлуатації. У сучасних тракторах із електронним керуванням двигуном дедалі частіше застосовують пропорційно-інтегрально-диференціальні регулятори (ПІД-регулятори), які забезпечують вищу точність підтримання обертів [4].

Ефективність ПІД-регулятора суттєво залежить від правильного вибору його коефіцієнтів K_p , K_i , K_d . Метод налаштування Зіглера-Нікольса [5], хоч і широко розповсюджений завдяки простоті, базується на емпіричних формулах, отриманих для обмеженого класу об'єктів, і часто зумовлює надмірне перерегулювання в системах із великою інерційністю [6]. Недосконалість класичних методів налаштування спонукала до пошуку альтернативних підходів, зокрема алгоритму оптимізації роєм часток [7], який набув широкого застосування для автоматичного налаштування ПІД-регуляторів у різних галузях.

У роботі [8] PSO-оптимізований ПІД-регулятор було застосовано для керування швидкістю дизельного двигуна за критерієм інтегральної абсолютної похибки, що дало змогу суттєво покращити динамічні характеристики системи порівняно з класичними методами. У дослідженні [9] автори розробили PSO-ПІД-контролер для регулювання нахилу навісного обладнання гірських тракторів, який зменшив час відгуку на 28,52 % та перерегулювання на 43,87 % порівняно з традиційним ПІД-регулятором. Автори роботи [10] запропонували нечіткий ПІД-контролер зі змінним універсумом для керування глибиною обробітку ґрунту в системі «трактор – знаряддя», порівнявши його з класичним та нечітким ПІД-регуляторами. У статті [11] висвітлено систему керування глибиною обробітку на базі нечіткого ПІД-регулятора для самохідного електричного культиватора, яка забезпечила зменшення варіації глибини на 24 %. У роботі [12] досліджено PSO-оптимізований

нечіткий ПІД-контролер для керування гідравлічною системою тракторів.

Аналіз літератури свідчить, що, попри значну кількість публікацій щодо застосування PSO для налаштування ПІД-регуляторів у сільськогосподарській техніці, залишається недостатньо дослідженим питання автоматичного налаштування ПІД-регулятора саме частоти обертання ВВП трактора. Зокрема, це стосується комплексного аналізу стійкості замкненої системи за критерієм Гурвіца, визначення аналітичних умов для коефіцієнтів регулятора та дослідження робастності за варіації параметрів об'єкта.

Мета дослідження

З'ясувати ефективність застосування методу оптимізації роєм часток для налаштування ПІД-регулятора частоти обертання вала відбору потужності трактора, а також охарактеризувати стійкість і робастність отриманої системи керування.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

1. побудувати математичну модель системи керування частотою обертання ВВП;
2. виконати налаштування ПІД-регулятора методами Зіглера-Нікольса та PSO;
3. довести стійкість замкненої системи за критерієм Гурвіца й отримати аналітичні умови для коефіцієнтів регулятора;
4. визначити запаси стійкості та дослідити робастність системи.

Матеріали і методи

Дослідження проведено методами математичного моделювання та комп'ютерного моделювання. Об'єктом дослідження є узагальнена модель системи автоматичного керування частотою обертання вала відбору потужності трактора середнього тягового класу. Параметри моделі обрано як узагальнені, типові для цього класу машин, на основі аналізу опублікованих математичних моделей приводних ліній ВВП [2, 8, 9]. Побудову математичної моделі та виведення передавальних функцій здійснено відповідно до класичної теорії автоматичного керування [4, 6] із застосуванням перетворення Лапласа.

Налаштування коефіцієнтів ПІД-регулятора виконано двома методами: класичним методом Зіглера-Нікольса [5] та методом оптимізації роєм часток [7]. Як цільову функцію для алгоритму PSO обрано критерій інтегральної абсолютної похибки, зваженої за часом. Стійкість замкненої системи досліджено за критерієм Рауса-Гурвіца [9].

Моделювання перехідних процесів проведено за двома сценаріями: вихід на робочі оберти та стрибкоподібне збільшення навантаження. Робастність регуляторів оцінено статистичним методом Монте-Карло [10] за одночасної варіації параметрів об'єкта в межах, що перекривають розкид характеристик між різними моделями тракторів цього класу. Усі параметри моделювання, зокрема й

налаштування алгоритму PSO, межі пошуку коефіцієнтів та діапазони варіації параметрів для аналізу робастності, наведено у відповідних розділах статті.

Результати та їх обговорення

Система автоматичного керування частотою обертання ВВП складається з трьох підсистем: привода, трансмісії з ВВП та навантаження від сільськогосподарського знаряддя. ПД-регулятор формує керівний сигнал $u(t)$ на основі похибки: $e(t) = \omega_r - \omega_f$, де ω_r – задана, а ω_f – фактична частота обертання ВВП.

Об'єктом дослідження є узагальнена модель системи автоматичного керування частотою обертання ВВП, побудована для тракторів середнього тягового класу потужністю ВВП 40–60 кВт зі стандартною частотою обертання 540 об/хв відповідно до ISO 500 [1]. Оскільки метою роботи є дослідження ефективності методу PSO як інструменту налаштування ПД-регулятора, а не аналіз конкретної моделі трактора, прийнято підхід узагальненого моделювання, за якого параметри об'єкта обирають у межах діапазонів, характерних для цього класу машин.

На основі порядку величин сформовано узагальнений набір параметрів (табл. 1).

Таблиця 1

Параметри узагальненої моделі системи керування ВВП

Параметр	Позначення	Значення
Коефіцієнт підсилення двигуна	K_e	50 Н·м/од.
Стала часу двигуна	T_e	0,3 с
Зведений момент інерції	J	2,5 кг·м ²
Коефіцієнт в'язкого тертя	b	0,8 Н·м·с/рад
Передавальне число редуктора ВВП	i	3,5
ККД трансмісії	η	0,92

Усі параметри таблиці 1 є вхідними даними, що описують об'єкт керування. Динаміку двигуна від сигналу керування $u(t)$ до крутного моменту $Me(t)$ описано диференціальним рівнянням першого порядку [6, 8]:

$$T_e \cdot \frac{dMe(t)}{dt} + Me(t) = K_e \cdot u(t) \quad (1)$$

де $T_e = 0,3$ с – стала часу двигуна, що характеризує інерційність камери згорання та паливної системи; $K_e = 50$ Н·м/од. – коефіцієнт підсилення двигуна; $u(t)$ – сигнал керування.

Застосуємо перетворення Лапласа до рівняння (1):

$$T_e \cdot s \cdot Me(s) + Me(s) = K_e \cdot U(s)$$

Звідси передавальна функція двигуна:

$$Ge(s) = \frac{Me(s)}{U(s)} = \frac{K_e}{T_e \cdot s + 1} \quad (2)$$

Рівняння руху обертової системи «трансмісія – ВВП – знаряддя» запишемо за другим законом

Ньютона для обертального руху у часовій області [6, 8]:

$$J \cdot \frac{d\omega(t)}{dt} = Me(t) \cdot i \cdot \eta - Ml(t) - b \cdot \omega(t) \quad (3)$$

де $J = 2,5$ кг·м² – зведений момент інерції; $\omega(t)$ – кутова швидкість ВВП, рад/с; $i = 3,5$ – передавальне число редуктора ВВП; $\eta = 0,92$ – ККД трансмісії; $Ml(t)$ – момент навантаження від знаряддя, Н·м; $b = 0,8$ Н·м·с/рад – коефіцієнт в'язкого тертя.

Застосуємо перетворення Лапласа до рівняння (3) та перегрупуємо його параметри, без урахування збурення отримаємо:

$$Gt(s) = \frac{\Omega(s)}{Me(s)} = i \cdot \frac{\eta}{J \cdot s + b} \quad (4)$$

Загальна передавальна функція від сигналу керування u до частоти обертання ω є добутком послідовно з'єднаних ланок (2) та (4):

$$G(s) = Ge(s) \cdot Gt(s) = \left[\frac{K_e}{T_e \cdot s + 1} \right] \cdot \left[\frac{i \cdot \eta}{J \cdot s + b} \right] \quad (5)$$

Передавальна функція (5) описує динаміку об'єкта керування – тобто те, як вал ВВП реагує на вхідний сигнал. Для забезпечення стабільної частоти обертання за змінного навантаження необхідно використати зворотний зв'язок, у якому регулятор формуватиме керівний сигнал $u(t)$ на основі відхилення фактичної частоти обертання від заданої. Для цього використано формулу класичного ПД-регулятора [6]:

$$u(t) = Kp \cdot e(t) + Ki \cdot \int_0^t e(t) dt + Kd \cdot \frac{de(t)}{dt} \quad (6)$$

де: $e(t)$ – похибка регулювання; Kp – пропорційний коефіцієнт; Ki – інтегральний коефіцієнт; Kd – диференціальний коефіцієнт.

Для подальшого аналізу стійкості необхідно отримати передавальну функцію регулятора $C(s)$. Застосуємо перетворення Лапласа до рівняння (6). Водночас функції часової області переходять у функції комплексної змінної: сигнал похибки $e(t) \rightarrow E(s)$, сигнал керування $u(t) \rightarrow U(s)$, де $E(s)$ та $U(s)$ – їхні зображення за Лапласом. Оскільки $E(s)$ є спільним множником у всіх трьох доданках, виносимо його та зводимо вираз до спільного знаменника:

$$C(s) = \frac{U(s)}{E(s)} = \frac{Kd \cdot s^2 + Kp \cdot s + Ki}{s} \quad (7)$$

де $C(s)$ – передавальна функція регулятора, що показує залежність керівного сигналу $U(s)$ від похибки $E(s)$.

Передавальна функція (7) разом із передавальною функцією об'єкта (5) дозволяє записати характеристичний поліном замкненої системи для визначення стійкості за критерієм Гурвіца.

У роботі розглянуто два способи налаштування коефіцієнтів ПД-регулятора, що відрізняються ступенем автоматизації та якістю отриманих результатів. Перший – класичний метод Зіглера-Нікольса [11],

другий – автоматична оптимізація методом рою частинок [4].

Метод Зіглера-Нікольса базується на експериментальному або розрахунковому визначенні двох параметрів об'єкта за його кривою розгону: запізнення L – час, протягом якого вихідна величина не реагує на вхідний сигнал, та стала часу T – час, за який вихідна величина досягає 63 % від усталеного значення. За цими двома параметрами коефіцієнти ПІД-регулятора обчислюються за емпіричними формулами, отриманими авторами на основі аналізу великої кількості промислових об'єктів:

$$K_p = \frac{1,2 \cdot T}{K \cdot L}; K_i = \frac{K_p}{2 \cdot L}; K_d = 0,5 \cdot L \cdot K_p \quad (8)$$

де K – статичне підсилення об'єкта. Перевагою методу є простота та відсутність потреби в побудові точної математичної моделі. Для досліджуваного об'єкта отримано: $L = 0,195$ с, $T = 3,972$ с. За формулами (8) отримано: $K_p = 0,123$, $K_i = 0,315$, $K_d = 0,012$.

Метод рою часток є метаевристичним алгоритмом оптимізації, який не потребує обчислення значень градієнта цільової функції. Алгоритм оперує множиною з N часток, кожна з яких є точкою у тривимірному просторі пошуку та відповідає набору коефіцієнтів $[K_p, K_i, K_d]$.

Параметри PSO: кількість часток $N = 30$, кількість ітерацій $k_{max} = 80$, когнітивний та соціальний коефіцієнти $c_1 = c_2 = 1,5$, інерційна вага з лінійним зменшенням від 0,9 до 0,4 [6]. Межі пошуку: $K_p \in [0,1; 20]$, $K_i \in [0,01; 15]$, $K_d \in [0,001; 5]$.

Як цільову функцію алгоритму PSO обрано критерій інтегральної абсолютної похибки, зваженої за часом [6]:

$$F = \int_0^T t \cdot |e(t)| dt \rightarrow \min \quad (9)$$

де $e(t) = \omega_r - \omega_f$ – похибка регулювання; T – час моделювання.

Алгоритм збігся приблизно за 20 ітерацій (рис. 1) і знайшов оптимальні коефіцієнти: $K_p = 3,631$, $K_i = 15,000$, $K_d = 0,255$.

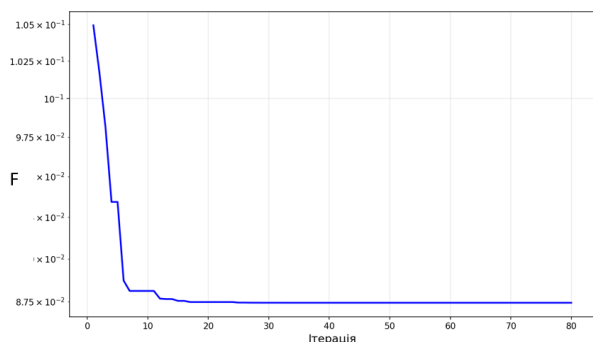


Рис. 1. Збіжність алгоритму PSO

Для забезпечення стійкості замкненої системи застосовано критерій Рауса-Гурвіца [9]. За характеристичним рівнянням (4) складено матрицю Гурвіца, обчислено її діагональні мінори Δ_1 , Δ_2 , Δ_3 та записано необхідну і достатню умову стійкості у вигляді

системи нерівностей $\Delta_1 > 0$, $\Delta_2 > 0$, $\Delta_3 > 0$. Розв'язання цих нерівностей дозволило виразити допустимі межі коефіцієнтів регулятора через параметри об'єкта керування, зокрема ключову умову:

$$K_i < (a_1 + K \cdot K_d) \cdot \frac{a_0 + K \cdot K_p}{K \cdot a_2}, \quad (10)$$

де a_1 , a_0 , a_2 – коефіцієнти знаменника передатної функції об'єкта (5); K – загальний коефіцієнт підсилення. Яка обмежує допустиме значення інтегрального коефіцієнта при заданих K_p та K_d . Умови на пропорційний та диференціальний коефіцієнти ($K_p > 0$, $K_d \geq 0$) виконуються завжди з фізичних міркувань. На основі отриманих умов стійкості встановлено межі області пошуку для алгоритму PSO (табл. 2).

Таблиця 2

Межі пошуку коефіцієнтів регулятора, які забезпечують стійкість системи керування ВВП

Коефіцієнт	Область пошуку PSO
K_p	0,1 ... 20,0
K_i	0,01 ... 15,0
K_d	0,001 ... 5,0

Отримані межі дають змогу виконати пошук невідомих коефіцієнтів регулятора алгоритмом PSO, за яких система буде стійкою. PSO знайшов оптимальні коефіцієнти: $K_p = 3,631$, $K_i = 15,0$, $K_d = 0,255$.

Перевіримо умову (10): $K_i < (2,74 + 161 \times 0,2546)(0,80 + 161 \times 3,6305) / 120,75 = 43,73 \times 585,3 / 120,75 = 212,0$. Оскільки $K_i = 15,0 < 212,0$, умова виконується з великим запасом.

Аналогічну перевірку виконано для методу Зіглера-Нікольса та занесено до порівняльної таблиці (табл. 3).

Таблиця 3

Результати визначення стійкості за критерієм Гурвіца

Показник	PSO-ПІД	Зіглера-Нікольса
Δ_1	58,31 > 0	6,21 > 0
$\Delta_2 = a_1 a_2 - a_3$	42 273 > 0	102,6 > 0
$\Delta_3 = a_3 \Delta_2$	$1,36 \times 10^8 > 0$	6943 > 0

Із таблиці 3 випливає, що обидві системи відповідають критерію стійкості Гурвіца, отже, замкнені контури керування є стійкими. Водночас абсолютні величини визначників суттєво різняться: для PSO-ПІД вони на кілька порядків перевищують відповідні показники системи, налаштованої за методом Зіглера-Нікольса. Це свідчить про значно більший запас стійкості регулятора, синтезованого за допомогою PSO, тоді як параметри Зіглера наближають систему до межі стійкості.

Оскільки критерій Гурвіца є необхідною, але не достатньою умовою якості керування й не дає кількісної характеристики динамічних показників перехідного процесу – швидкодії, перерегулювання та тривалості коливаль.

Моделювання виходу на задану частоту 540 об/хв (рис. 2) показало: PSO-ПІД забезпечив час

наростання 0,029 с, водночас максимальне нормоване значення частоти обертання досягло $\frac{\omega}{\omega_r} = 1,12$, що відповідає перерегулюванню 12 %. Система увійшла в зону $\pm 5\%$ від заданого значення та залишилася в ній через 0,17 с. Регулятор, налаштований за методом Зіглера-Нікольса, вийшов на задане значення повільніше (час наростання становив 0,248 с), а максимум $\frac{\omega}{\omega_r}$ сягав $\omega_r = 1,42$. Коливання тривали понад 4 секунди у діапазоні $\frac{\omega}{\omega_r}$ від 0,90 до 1,42, що узгоджується з його низьким запасом за фазою.

У разі збільшення коефіцієнта навантаження до $M_I=0.5$ у момент $t = 5$ с (рис. 3) PSO-ПІД-регулятор продемонстрував мінімальне відхилення, тоді як метод Зіглера-Нікольса показав коливальний процес з амплітудою до 2.2 від заданого значення.

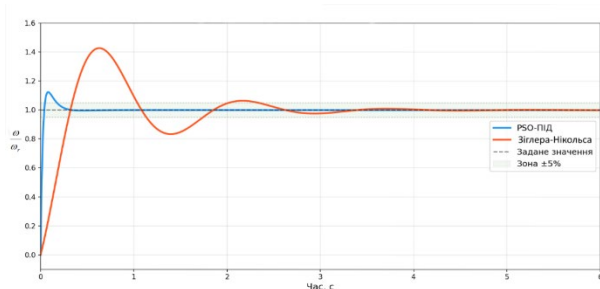


Рис. 2. Перехідний процес під час виходу на робочі оберт 540 об/хв. При $M_I=0$

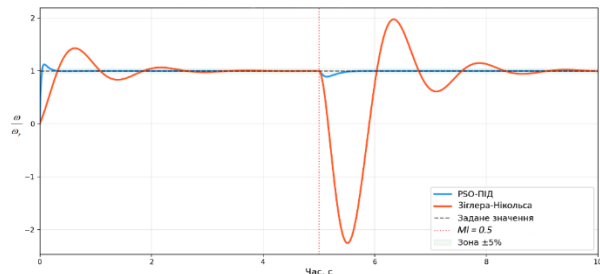


Рис. 3. Реакція на збільшення коефіцієнта навантаження до $M_I=0.5$ у момент часу $t = 5$ с.

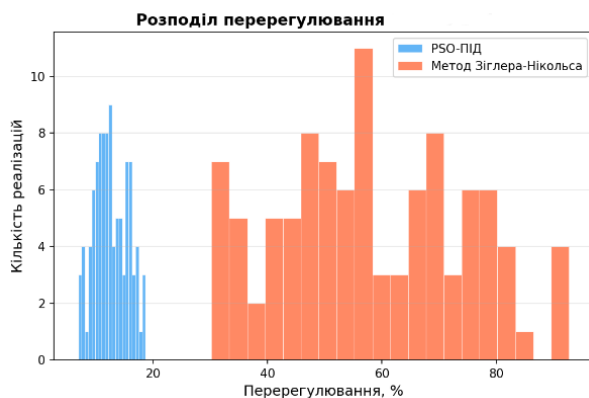


Рис. 4. Гістограми розподілу перерегулювання (ліворуч) та інтегральної абсолютної похибки (праворуч)

Отримані результати підтверджують ефективність методу PSO для налаштування ПІД-регулятора в

системах із високою інерційністю та змінним навантаженням. В оглядових роботах [4, 6] підтверджено,

Таблиця 4

Показники перехідних процесів

Значення	PSO-ПІД	Зіглера-Нікольса
K_p, K_i, K_d	3,63, 15,0, 0,25	0,12, 0,32, 0,01
Час наростання, с	0,029	0,248
Перерегулювання, %	12,4	97,1
Інтегральна абсолютна похибка	0,177	16,06

Як видно з таблиці 4, метод налаштування ПІД-регулятора за допомогою методу рою часток переважає за всіма параметрами метод Зіглера-Нікольса. Система виходить на задані оберти значно швидше, тоді як метод Зіглера-Нікольса демонструє майже дворазове перевищення заданого значення та тривалі коливання.

Аналіз стійкості виконано для номінальних параметрів об'єкта. Однак у реальних умовах параметри системи не є точно відомими та змінюються в процесі експлуатації. Метод Монте-Карло [12] дозволяє статистично оцінити, наскільки добре регулятор зберігає якість роботи при невизначеності параметрів.

Для оцінки робастності отриманих регуляторів згенеровано 100 випадкових реалізацій, у кожній з яких параметри об'єкта (J, b, K_e, T_e) одночасно варіювалися у межах $\pm 30\%$ від номінальних значень, що відповідає розкиду характеристик між різними моделями тракторів та змінам параметрів у процесі експлуатації. Коефіцієнти регулятора при цьому залишалися фіксованими. Результати (рис. 4) показали, що обидва регулятори зберігають стійкість при всіх 100 реалізаціях, однак якість регулювання суттєво різниться: PSO-ПІД тримається нижче допустимого перерегулювання 15 % у переважній більшості реалізацій, тоді як метод Зіглера-Нікольса демонструє перерегулювання від 30 до понад 100 %, що є неприйнятним для більшості сільськогосподарських операцій.

що метод Зіглера-Нікольса дає агресивні налаштування з надмірним перерегулюванням для інерційних об'єктів. Аналогічні переваги методу рою часток над іншими підходами розглянуто для суміжних задач сільськогосподарської техніки: керування електро-приводом сівалки [13], висіву кукурудзи [14], жатки комбайна [15], керування швидкістю безпілотного зернозбирального комбайна [21] та стабілізації руху трактора [19]. У дослідженнях [10, 11] для систем «трактор – знаряддя» показано ефективність інтелектуальних методів налаштування порівняно з класичним ПД, а в [20] аналогічний підхід із оптимізацією ПД методом рою часток забезпечив стабілізацію параметрів у задачі точного зрошення в рослинництві. У роботах [16, 17] для нелінійних систем керування також отримано зменшення перерегулювання та покращення робастності за умови заміни емпіричних методів на оптимізацію методом рою часток, а в [22] аналіз робастності нечіткого ПД для нелінійної системи автоматичного регулювання підтвердив переваги метаевристичної оптимізації над ручним налаштуванням. Для автономного сільськогосподарського робота [18] отримано зменшення похибки траєкторії у 5,7 раза завдяки застосуванню нечіткого ПД.

Висновки

У роботі побудовано узагальнену математичну модель системи керування частотою обертання вала відбору потужності трактора та виконано налаштування ПД-регулятора двома методами: методом Зіглера-Нікольса та методом рою часток. Стійкість замкненої системи доведено за критерієм Гурвіца, з якого отримано аналітичні умови на коефіцієнти регулятора, що визначають межі допустимих значень. Метод рою часток забезпечив перерегулювання 12,4 % проти 97,1 % та запас за фазою 79,0° проти 33,8° для методу Зіглера-Нікольса. Аналіз робастності методом Монте-Карло підтвердив стійкість оптимізованого регулятора у 100 % реалізацій при варіації параметрів об'єкта ± 30 %.

Перспективи подальших досліджень полягають у модифікації алгоритму рою часток шляхом введення адаптивних коефіцієнтів інерції та навчання, а також у гібридизації методу рою часток із генетичним алгоритмом або нечіткою логікою для підвищення швидкості збіжності та якості знайдених рішень в умовах робочого навантаження на вал відбору потужності.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Не застосовується.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання ІІІ та технологій на основі ІІІ

Автори заявляють, що не використовували штучний інтелект або технології на основі ІІІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. International Organization for Standardization. (2014). *Agricultural tractors – Rear-mounted power take-off types 1, 2, 3 and 4 – Part 1: General specifications, safety requirements, dimensions for master shield and clearance zone* (ISO Standard No. 500-1:2014). <https://www.iso.org/standard/56698.html>
2. Shao, X., Zheng, B., Luo, Z., & Song, Z. (2022). Establishment and validation of a structural dynamics model with power take-off driveline for agricultural tractors. *Agriculture*, 12(9), 1297. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091297>
3. Renius, K. T. (2020). *Fundamentals of tractor design*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-32804-7>
4. Borase, R. P., Maghade, D. K., Sondkar, S. Y., & Pawar, S. N. (2020). A review of PID control, tuning methods and applications. *International Journal of Dynamics and Control*, 9(2), 818–827. <https://doi.org/10.1007/s40435-020-00665-4>
5. Ziegler, J. G., & Nichols, N. B. (1942). Optimum settings for automatic controllers. *Journal of Fluids Engineering*, 64(8), 759–765. <https://doi.org/10.1115/1.4019264>
6. Joseph, S. B., Dada, E. G., Abidemi, A., Oyewola, D. O., & Khammas, B. M. (2022). Metaheuristic algorithms for PID controller parameters tuning: review, approaches and open problems. *Heliyon*, 8(5), e09399. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09399>
7. Kennedy, J., & Eberhart, R. (1995). Particle swarm optimization. In *Proceedings of ICNN'95 - International Conference on Neural Networks* (Vol. 4, pp. 1942–1948). IEEE. <https://doi.org/10.1109/icnn.1995.488968>
8. Fu, J., Gu, S., Wu, L., Wang, N., Lin, L., & Chen, Z. (2025). Research on optimization of diesel engine speed control based on UKF-filtered data and PSO fuzzy PID control. *Processes*, 13(3), 777. <https://doi.org/10.3390/pr13030777>
9. Wu, Y., Yao, C., Liu, M., Zhang, J., Wang, L., Du, X., & Yan, X. (2025). PSO-PID-based optimization and HIL verification method for the rear-mounted linkage adjustment of hilly-mountainous tractors. *Discover Applied Sciences*, 7, 850. <https://doi.org/10.1007/s42452-025-07543-8>
10. Gao, Q., Lu, Z., Xue, J., Gao, H., & Sar, D. (2021). Fuzzy-PID controller with variable universe for tillage depth control on tractor-implement. *Journal of Computational Methods in Sciences and Engineering*, 21(1), 19–29. <https://doi.org/10.3233/jcm-204264>
11. Xiao, M. H., Ma, Y., Wang, C., Chen, J. Y., Zhu, Y. J., Bartos, P., & Geng, G. S. (2023). Design and experiment of fuzzy-PID based tillage depth control system for a self-propelled electric tiller. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 16(4), 116–125. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20231604.8116>
12. Skogestad, S., & Postlethwaite, I. (2005). *Multivariable feedback control: Analysis and design* (2nd ed.). Wiley.
13. Wang, S., Zhao, B., Yi, S., Zhou, Z., & Zhao, X. (2022). GAPSO-optimized fuzzy PID controller for electric-driven seeding. *Sensors*, 22(17), 6678. <https://doi.org/10.3390/s22176678>
14. Zhao, S., & Zhang, Y. (2024). Design and field test of corn seeding system base on fuzzy PID control method combine with PSO. *Engenharia Agricola*, 44, e20230123. <https://doi.org/10.1590/1809-4430-eng.agric.v44e20230123/2024>

15. Zheng, J., Wang, X., Huang, X., Shi, Y., Zhang, X., Wang, Y., Wang, D., Wang, J., & Zhang, J. (2025). Adaptive control system of header for cabbage combine harvester based on IPSO-fuzzy PID controller. *Computers and Electronics in Agriculture*, 232, 110044. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2025.110044>
16. Aner, E. A., Awad, M. I., & Shehata, O. M. (2024). Performance evaluation of PSO-PID and PSO-FLC for continuum robot's developed modeling and control. *Scientific Reports*, 14, 733. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50551-0>
17. Shahouni, R., Bahraini, M., Abrofarakh, M., & Abbasi, M. (2025). Adaptive tuning of fractional order PID controllers for nonlinear processes using hybrid PSO DQN reinforcement learning. *Scientific Reports*, 15, 38545. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-22509-x>
18. Hailu, G. L., & Yatayew, T. T. (2025). Intelligent trajectory tracking in autonomous plantation robots using PSO-tuned nonlinear fuzzy PID, fuzzy PID, and conventional PID controllers. *Scientific Reports*, 15, 45357. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-30167-2>
19. Gade, C. R., Sultana, R., & Sunitha, V. (2025). Towards sustainable farming: A state of art review on electrification of a farm tractor. *Results in Engineering*, 25, 104403. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2025.104403>
20. Oleiwi, S. Z., Khaleel, H. Z., Khaleel, R. Z., Msallam, M. M., & Humaidi, A. J. (2026). Smart IoT irrigation system using PID-PSO optimization method. *Advances in Technology Innovation*, 11(1), 70–78. <https://doi.org/10.46604/aiti.2026.15357>
21. Zhang, S., Zang, C., Yang, Z., Tang, L., Wang, K., Wang, A., Chen, W., Song, Q., & Wei, X. (2025). Research on fault prediction and speed control system for unmanned combine harvesters based on IPSO-SVM and fuzzy logic. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1577175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1577175>
22. Dogruer, T., & Can, M. S. (2022). Design and robustness analysis of fuzzy PID controller for automatic voltage regulator system using genetic algorithm. *Transactions of the Institute of Measurement and Control*, 44(9), 1862–1873. <https://doi.org/10.1177/01423312211066758>

ORCID

- | | | |
|----------------|---|---|
| V. Makarets |  | https://orcid.org/0000-0002-9116-0784 |
| M. Ikalchyk |  | https://orcid.org/0000-0001-7085-2952 |
| V. Khropost |  | https://orcid.org/0000-0001-9363-3955 |
| A. Kushnirenko |  | https://orcid.org/0000-0001-8371-9165 |



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Журнал

«Scientific Progress & Innovations»

Том 29, № 2

2026

Підписано до друку з оригінал-макета 12.09.2026

Тираж 200 прим. Зам. № 2

Ум. друк. арк. 18,8. Формат 60х90/8

Головний редактор: Мельничук В. В.

Літературний редактор: Дедушно А. В.

Куратор з індексів DOI: Коваленко В. О.

Комп'ютерна верстка та дизайн: Мельничук В. В.

Видавець і виготовлювач:

Полтавський державний аграрний університет

Адреса: 36003, вул. Сковороди, 1/3, м. Полтава, Україна

Тел. (0532) 500273, E-mail: pdau@pdau.edu.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 7933 від 13.09.2023 р.