

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Modestas Kybartas

**KARVIŲ SPENIŲ ANTIMIKROBINIŲ
VILGIKLIŲ EKSPERIMENTINIŲ
PROTOTIPŲ MODELIAVIMAS IR
KOKYBINIS LYGINAMASIS ĮVERTINIMAS**

Daktaro disertacija
Žemės ūkio mokslai,
veterinarija (A 002)

Kaunas, 2025

Disertacija rengta 2015–2024 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos fakulteto Mikrobiologijos ir virusologijos institute.

Mokslinis vadovas

dr. Raimundas Mockeliūnas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – A 002).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

doc. dr. Dainius Zienius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – A 002).

Nariai:

prof. dr. Vytuolis Žilaitis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – A 002);

prof. dr. Gintaras Daunoras (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – A 002);

dr. Jonas Viškelis (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, žemės ūkio mokslai, agronomija – A 001);

prof. dr. Alberto Muñoz Prieto (Mursijos Universitetas (Ispanija), žemės ūkio mokslai, veterinarija – A 002).

Disertacija bus ginama viešame Veterinarijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2025 m. vasario 28 d. 13 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos dr. S. Jankausko auditorijoje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Modestas Kybartas

**MODELLING AND QUALITATIVE
COMPARATIVE ASSESSMENT OF
EXPERIMENTAL PROTOTYPES OF COW
UDDER ANTIMICROBIAL TEAT DIPS**

Doctoral Dissertation
Agricultural Sciences,
Veterinary (A 002)

Kaunas, 2025

Dissertation has been prepared at the Institute of Microbiology and Virology, Faculty of Veterinary, Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2015–2024.

Scientific Supervisor:

Dr. Raimundas Mockeliūnas (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – A 002).

Dissertation is defended at the Veterinary Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences.

Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Dainius Zienius (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – A 002).

Members:

Prof. Dr. Vytuolis Žilaitis (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – A 002);

Prof. Dr. Gintaras Daunoras (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – A 002);

Dr. Jonas Viškėlis (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forest, Agricultural Sciences, Agronomy – A 001);

Prof. Dr. Alberto Munoz Prieto (University of Murcia (Spain), Agricultural Sciences, Veterinary – A 002).

A dissertation will be defended at the open session of the Veterinary Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on 28th of February, 2025 at 1 p.m. in Dr. S. Jankauskas Auditorium of the Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

ĮVADAS.....	9
Darbo tikslas	10
Darbo uždaviniai.....	11
Mokslinio darbo naujumas	11
Praktinė reikšmė	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Aplinkos veiksnių ir melžimo higienos įtaka pieno kokybei	13
1.2. Aplinkos ir patogeninių mikroorganizmų įtaka tešmens sveikatingumui	15
1.3. Atsparių antibiotikams mikroorganizmų įtaka tešmens sveikatingumui ir pieno kokybei.....	18
1.4. Melžimo higienos įtaka pieno kokybei ir tešmens sveikatingumui	19
1.5. Tešmens higienos po melžimo ypatumai	21
1.6. Antiseptikai, biocidai ir dezinfektantai pienininkystėje.....	22
1.7. Spenių vilgiklių kūrimo principai	24
1.8. Spenių vilgiklių po melžimo sudėtinės medžiagos	25
1.8.1. Antibakterinės medžiagos vilgiklių sudėtyje	25
1.8.1.1. Pieno rūgštis	26
1.8.1.2. Chlorheksidinas.....	27
1.8.1.3. Jodas.....	28
1.8.2. Klampą reguliuojančios medžiagos	31
1.8.2.1. Guaro lipai.....	31
1.8.2.2. Ksantano lipai	32
1.8.3. Odą drėkinančios medžiagos	33
1.8.4. Augaliniai ekstraktai ir eteriniai aliejai spenių vilgiklių sudėtyje.....	34
1.8.5. Kitos pagalbinės medžiagos.....	36
1.8.5.1. Izopropilo alkoholis	36
1.8.5.2. pH reguliuojančios medžiagos.....	36
1.8.5.3. Dažikliai	37
1.9. Vilgiklių kokybės ir stabilumo vertinimas	37
1.9.1. Stabilumas	37
1.9.2. Tekstūra.....	38
1.9.3. Antimikrobinų medžiagų skvarbos į odą tyrimai.....	40
2. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGOS	42
2.1. Tyrimų atlikimo vieta, laikas, etapai ir tyrimo planas.....	42
2.2. Vilgiklių eksperimentinių kompozicijų (EK) kūrimas ir gamybos metodika	43
2.3. EK reologinių savybių vertinimo metodika <i>in vivo</i>	44
2.4. Stabilumo programos metodika	46
2.5. Fizikinių savybių bei mikrobiologinio pokyčio įvertinimas stabilumo tyrimų metu	47
2.5.1. Klampos matavimo metodika	47
2.5.2. pH matavimo metodika.....	47
2.5.3. Centrifugavimo testo metodika.....	47

2.5.4.	Produkto išvaizdos stebėseną.....	48
2.5.5.	Jodo kiekio nustatymo metodika.....	48
2.5.6.	Bakterinės taršos tyrimo metodika.....	49
2.6.	Mėginių tekstūros analizės tyrimo metodika	50
2.7.	Antimikrobinų medžiagų skvarbos į odą <i>ex vivo</i> tyrimo metodika.....	50
2.8.	EK antimikrobinio poveikio <i>in vitro</i> su referentinėms mikroorganizmų kultūromis tyrimo metodika	51
2.9.	EK antimikrobinio poveikio <i>in vitro</i> su klinikinėmis mikroorganizmų kultūromis tyrimo metodika	52
2.10.	Statistinė duomenų analizė.....	52
3.	TYRIMŲ REZULTATAI.....	54
3.1.	Spenių vilgiklių tiriamųjų kompozicijų kūrimas ir gamyba.....	54
3.2.	Eksperimentinių kompozicijų reologinių savybių vertinimo <i>in vivo</i> ir atrankos rezultatai	55
3.3.	EK fizikinių savybių bei mikrobiologinio pokyčio rezultatai stabilumo tyrimų metu	59
3.3.1.	Realaus laiko stabilumo programos rezultatai	59
3.3.2.	Pagreitinto laiko stabilumo programos rezultatai	63
3.4.	Tekstūros analizės tyrimo rezultatai.....	65
3.5.	Antimikrobinų medžiagų skvarbos į odą <i>ex vivo</i> tyrimo rezultatai.....	67
3.6.	EK antimikrobinio poveikio <i>in vitro</i> su referentinėms mikroorganizmų kultūromis tyrimo rezultatai	69
3.7.	EK antimikrobinio poveikio <i>in vitro</i> su klinikinėmis mikroorganizmų kultūromis tyrimo rezultatai	73
3.8.	Sukurtų vilgiklių savybių palyginimas.....	75
4.	TYRIMŲ REZULTATŲ APTARIMAS	78
	IŠVADOS	89
	REKOMENDACIJOS	91
	SUMMARY	92
	BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS.....	134
	PASKELBTOS PUBLIKACIJOS	148
	DOKTORANTO STRAIPSNIŲ KOPIJOS, KURIOSE SKELBIAMI SVARBIAUSI TYRIMŲ REZULTATAI	150
	PRIEDAI.....	172
	CURRICULUM VITAE	190
	PADĖKA	193

SANTRUMPOS

<i>A. niger</i>	– <i>Aspergillus niger</i>
angl.	– angliškai
ATP	– adenozino trifosfatas
AV	– absorbcijos vienetai (angl. <i>absorbance units</i> , AU)
BBS	– bendras bakterijų skaičius (angl. <i>total bacteria count</i> , TBC)
<i>B. subtilis</i>	– <i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. albicans</i>	– <i>Candida albicans</i>
<i>C. bovis</i>	– <i>Corynebacterium bovis</i>
<i>C. freundii</i>	– <i>Citrobacter freundii</i>
<i>C. neoformans</i>	– <i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>C. rugosa</i>	– <i>Candida rugosa</i>
Ca ²⁺	– kalcio jonai
CAS	– cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. <i>Chemical Abstracts Service</i>) suteiktas medžiagos registracijos numeris
CHD-1	– eksperimentinė kompozicija (EK) su chlorheksidinu Nr. 1
CHD-2	– eksperimentinė kompozicija (EK) su chlorheksidinu Nr. 2
CHD-3	– eksperimentinė kompozicija (EK) su chlorheksidinu Nr. 3
CHD	– chlorheksidino digliukonatas
DNR	– deoksiribonukleino rūgštis
<i>E. cloacae</i>	– <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	– <i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	– <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	– <i>Enterococcus faecium</i>
EK	– eksperimentinė kompozicija (angl. <i>experimental formulation</i> , EF)
ES	– Europos Sąjunga
FAO	– Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacija (angl. <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
<i>ex vivo</i>	– iš gyvo organizmo
g	– gramas
IMI	– intramaminė infekcija
<i>in vitro</i>	– dirbtinės sąlygos
<i>in vivo</i>	– gyvame organizme
IPA	– izopropilo alkoholis
JAV	– Jungtinės Amerikos Valstijos
JP-1	– eksperimentinė kompozicija (EK) su jodo povidonu Nr. 1
JP-2	– eksperimentinė kompozicija (EK) su jodo povidonu Nr. 2
JP-3	– eksperimentinė kompozicija (EK) su jodo povidonu Nr. 3
K ⁺	– kalio jonai
<i>K. pneumoniae</i>	– <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KNS	– koagulazės negaminantys stafilokokai (angl. <i>Coagulase-negative staphylococci</i> , CoNS)
KSV	– kolonijas sudarantys vienetai
<i>L. monocytogenes</i>	– <i>Listeria monocytogenes</i>
Log R	– antimikrobinis efektyvumas
LSMU	– Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
m ²	– kvadratinis metras

mg	– miligramas
Mg ²⁺	– magnio jonai
mėn.	– mėnesis
mm	– milimetras
ml	– mililitras
mln.	– milijonas
mol	– molis
mPa·s	– miliPascal sekundė
MRSA	– meticilinui atsparus <i>Staphylococcus aureus</i>
NMC	– JAV Nacionalinė mastito taryba (angl. <i>National Mastitis Council</i>)
Nr.	– numeris (angl. No)
p	– patikimumo kriterijus
<i>P. aeruginosa</i>	– <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. mirabilis</i>	– <i>Proteus mirabilis</i>
pH	– aktyvusis rūgštingumas
NVSP	– Nacionalinė visuomenės sveikatos priežiūros laboratorija
ppm.	– milijoninės dalys (angl. <i>parts per million</i>)
proc. (%)	– procentai
PR-1	– eksperimentinė kompozicija (EK) su pieno rūgštimi Nr. 1
PR-2	– eksperimentinė kompozicija (EK) su pieno rūgštimi Nr. 2
PR-3	– eksperimentinė kompozicija (EK) su pieno rūgštimi Nr. 3
PSO	– Pasaulio sveikatos organizacija
<i>P. zopfii</i>	– <i>Prototheca zopfii</i>
RNR	– ribonukleino rūgštis
<i>S. aureus</i>	– <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. agalactiae</i>	– <i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. dysgalactiae</i>	– <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>S. enterica</i>	– <i>Salmonella enterica</i>
<i>S. marcescens</i>	– <i>Serratia marcescens</i>
<i>S. uberis</i>	– <i>Streptococcus uberis</i>
SLS	– somatinių ląstelių skaičius (angl. <i>somatic cell count</i> , SCC)
spp.	– mikroorganizmo šeimos ar genties pavadinimo pažymėti visas toje šeimoje ar gentyje esančias migruojančias rūšis
STM	– standartinis tyrimo metodas
TPA	– tekstūros profilio analizę
T/N	– tyrimas netaikomas (angl. <i>not applicable</i> , N/A)
t. y.	– tai yra
VA	– Veterinarijos akademija
val.	– valanda
VĮ	– valstybinė įmonė
VTEC	– verotoksiną gaminančios <i>E. coli</i>
V/V	– tūrio koncentracija
q. s.	– reikiamas kiekis (lot. <i>quantum satis</i>)
µl	– mikrolitras

IVADAS

Pieno produktai yra svarbi žmonių mitybos dalis, todėl žaliavinis pienas privalo būti aukščiausios kokybės. Tačiau pieno perdirbimo įmonės ir ūkininkai, besiverčiantys pienininkyste, susiduria su problemomis. Viena jų – mastitas, taip pat aukštas somatinių ląstelių skaičius (SLS) ir bendras bakterijų skaičius (BBS), kurie dažnai priklauso nuo karvių laikymo ir higienos sąlygų bei melžimo technologijų. Laikantis ūkio higienos, gerinant sanitarijos būklę ir naudojant tinkamus tešmens paruošimo metodus, pieno bakterinis užterštumas gali sumažėti iki 90 proc., o mastito atvejų skaičius – 50–75 proc. Siekiant užkirsti kelią infekcijos plitimui ūkiuose, mastito prevencijai taikomos įvairios priemonės. Viena jų yra spenių antiseptika, atliekama prieš ir po melžimo [1]. Tam naudojami įvairūs purškalai, valikliai ir vilgikliai. Plačiausiai taikoma procedūra – spenių vilgymas. Ši procedūra laikoma esminiu metodu, mažinant bakterijų skaičių ant spenių odos ir piene.

Pamerkus spenį į antiseptinį vilgiklį, ant jo galo susidaro lašas tirpalo, kuris veikia kaip fizinis barjeras, saugantis tešmenį nuo užkratų patekimo. Šiuo būdu vilgiklis apsaugo spenio kanalą tarp melžimų, užkirsdamas kelią užkrečiamojo ir aplinkos mastito etiologinių veiksnių plitimui bei naikindamas mikroorganizmus ant spenių odos [1–3].

Pagal Ozsvari ir Ivanyos [4] aprašymą, vilgiklis, skirtas spenių higienai po melžimo, turi būti antimikrobiškai aktyvus, tinkamo klampumo, lipnus, gerai laikytis ant spenio paviršiaus ir vienodai jį padengti. Be to, vilgiklis turi sudaryti barjerinę plėvelę, kuri apsaugotų spenį nuo patogeninių mikroorganizmų patekimo, nedirgintų odos, o sudėtyje esančios medžiagos drėkintų spenių odą, kad ji išliktų minkšta, netrūkinėtų ir greičiau gytų. Be to, vilgiklis turi būti matomas ant spenio, todėl jo sudėtyje turėtų būti dažiklio arba veikliosios medžiagos, suteikiančios produktui spalvą.

Antiseptiniai vilgikliai, skirti karvių tešmens ir spenių odos higienai po melžimo, yra biocidiniai produktai, kurių tiekimą į rinką ir naudojimą nustato Europos Sąjungos reglamentas (ES) Nr. 528/2012 [5] dėl biocidinių produktų tiekimo rinkai ir jų naudojimo, taip pat kiti su tuo susiję ES reglamentai ir Lietuvos teisės aktai. Šiuose dokumentuose nurodoma, kokias veikliąsias medžiagas gamintojai gali naudoti biocidinių produktų gamyboje.

Efektyvi antiseptinė priemonė turi veikti greitai ir užtikrinti platų antimikrobinio poveikio spektrą, nesukeldama žalos spenių odai ir nepalikdama inhibitorių piene. Skirtingų veikliųjų medžiagų panaudojimas biociduose garantuoja platų antiseptinių savybių spektrą. Veterinariniuose biociduose dažniausiai naudojamos veikliosios medžiagos yra chlorheksidinas, jodas ir

jo kompleksiniai junginiai, pieno rūgštis, vandenilio peroksidas ir peracto rūgštis [1, 6–8].

Kuriant spenių vilgiklius atsižvelgiama į tris esminius reikalavimus: pirma, jų sudėtyje turi būti baktericidiškai veikiančių medžiagų; antra, būtini komponentai, kurie saugo odą; trečia, turi būti naudojamos klampumą suteikiančios medžiagos. Suvilgius spenio odą, turi susidaryti vientisa plėvelė, apsauganti spenio kanalą nuo infekcijas sukeliančių mikroorganizmų patekimo. Vilgiklių klampumas reguliuojamas pasirenkant įvairių tipų tirštiklius ir jų skirtingas koncentracijas [9–11].

Vilgikliai kuriami naudojant plataus poveikio antibakterines medžiagas, pasižyminčias tiek bakteriostatinium, tiek bakteriocidiniu poveikiu prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas.

Vilgiklis turi gerai padengti spenį, nesudaryti pernelyg storos plėvelės. Klampą reguliuojančios medžiagos suteikia vilgikliams tinkamą konsistenciją, leidžiančią tirpalui išsilaikyti ant spenio pakankamai ilgai. Be to, vilgiklis turi pasižymėti stabiliais fizikiniais ir cheminiais rodikliais, nekintančia veikliosios antiseptinės medžiagos koncentracija bei sudedamųjų medžiagų suderinamumu [12, 13]. Vilgikliai turi užtikrinti ne tik apsaugą nuo patogeniškų mikroorganizmų, bet ir odos drėkinimą bei minkštinimą. Vilgikliuose naudojami dažikliai ir augaliniai ekstraktai, kurie suteikia vilgikliams spalvą, kvapą ir turi uždegimą mažinančių bei odą tausojančių savybių.

Lietuvos rinkoje yra produktų, skirtų karvių spenių ir tešmens higienai po melžimo. Tačiau pastebima, kad pienininkystės ūkiuose naudojami neautorizuoti ir nepakankamai efektyvūs vilgikliai. Naujų vilgiklių kūrimą skatina besivystantis bakterijų atsparumas ūkiuose naudojamiems antiseptikams, taip pat nurodomas neigiamas šių produktų sausinamasis poveikis spenių odai. Gyvulininkystės specialistų nuomone, trūksta vilgiklių, kurių kokybė ir efektyvumas būtų pagrįsti moksliniais tyrimais, jie būtų saugūs gyvūnams ir aplinkai, pasižymėtų tvarumu.

Darbo tikslas

Iš organinių medžiagų derinių sukurti melžiamoms karvėms po melžimo skirtus spenių vilgiklių eksperimentinius prototipus ir įvertinti jų savybių atitikimą vilgikliams keliamiems reikalavimams.

Darbo uždaviniai

1. Sukurti eksperimentines spenių vilgiklių kompozicijas, derinant antimikrobines medžiagas (pieno rūgštį, chlorheksidino digliukonata, jodo povidoną) su natūraliais tirštikliais, dažikliais ir augaliniais ekstraktais.
2. Nustatyti eksperimentinių vilgiklių reologines savybes *in vivo*.
3. Nustatyti eksperimentinių vilgiklių stabilumą, tekstūrą ir antimikrobinių medžiagų skvarbą į spenių odą.
4. Nustatyti eksperimentinių vilgiklių antimikrobinį poveikį referentinėms ir klinikinėms mikroorganizmų kultūroms.

Mokslinio darbo naujumas

Pirmą kartą suderintos antimikrobinės medžiagos (pieno rūgštis, chlorheksidino digliukonatas, jodo povidonas) su natūraliais tirštikliais, dažikliais ir augaliniais ekstraktais.

Pagal originalią metodiką ištirta *in vivo* lipų ir dažų koncentracijos įtaka vilgiklių reologinėms savybėms. Kuriamų vilgiklių prototipams panaudoti natūralių odą minkštinančių ir tausojančių augalinių ekstraktų ir eterinių aliejų deriniai, suteikiantys produktams tvarumą ir turintys kompleksinį antioksidacinį, priešuždegiminį, antimikrobinį bei žaizdų gijimą skatinantį poveikį.

Pirmą kartą kompleksiniais tyrimais nustatytas naujai sukurtų vilgiklių funkcionalumas, reologinės ir tekstūros savybės, antiseptinių medžiagų skvarba į odą bei antimikrobinis efektyvumas.

Pirmą kartą naujai sukurtiems vilgikliams nustatyta natūralios kilmės lipų įtaka sukurtų vilgiklių tekstūros savybėms, įvertinta guaro ir ksantano lipų įtaka vilgiklių klampumui, lipnumui, tvirtumui, stabilios plėvelės formavimui.

Pirmą kartą vertinant antiseptinių medžiagų skvarbos į odą savybes, eksperimente *ex vivo* buvo naudojama karvių spenių oda, kurios sudėtis ir struktūra skiriasi nuo itin dažnai medžiagų skvarbos į odą tyrimams *ex vivo* naudojamos gyvūnų (kiaulių, jūros kiaulyčių, žiurkių, pelių, triušių) arba bioinžinerinės odos.

Pirmą kartą Lietuvoje sukurtiems vilgikliams *in vitro* atliktas palyginamasis antimikrobinio poveikio vertinimas su referentinėmis ir klinikinėmis mikroorganizmų kultūromis.

Praktinė reikšmė

Sukomponuoti ir pateikti į rinką nauji tvarūs vilgikliai spenių higienai po melžimo su skirtingomis antiseptinėmis medžiagomis, skirtingais klampą formuojančiais lipais, natūraliais augaliniais ekstraktais, dažais, pagalbinėmis medžiagomis. Naudojant vilgiklius tikslinga įvertinti jų efektyvumą prieš cirkuliuojančius patogeninius mikroorganizmus konkrečiame ūkyje.

Atliktų tyrimų rezultatai yra svarbūs produktų, skirtų karvių spenių higienai po melžimo, tolimesniam kūrimui ir tobulinimui. Gauti tekstūros tyrimo rezultatai pagrindžia ryšį tarp formuluočių reologinių savybių ir klampą formuojančių lipų rūšies. Tyrimais *in vitro* ir *in vivo* nustatyta, kad modeliuojamuose vilgikliuose pagrįstai gali būti naudojama ksantano ir guaro lipai mažesnėmis ekonomiškoms koncentracijomis nei rekomenduoja gamintojai.

Gauti biofarmacinių tyrimų *ex vivo* rezultatai pagrindžia antiseptinių medžiagų bei vilgiklio klampą formuojančių sudedamųjų dalių skvarbos į odą skirtumus. Pasitelkiant šį tyrimo metodą galima optimizuoti vietinio poveikio spenių vilgiklių sudėtis, atrinkti sudedamąsias dalis, kurios neskatintų skvarbos ir taip antimikrobinės medžiagos nepasiektų gilesnių odos sluoksnių.

Sukurti nauji produktai (PROFIDIP vilgiklių linija, gamintojas UAB Ruvera), ištobulinta gamybos technologija, produktai naudojami pienininkystės ūkiuose Lietuvoje ir užsienyje, atliekama sklaida praktiniuose seminaruose ir konferencijose, mokymuose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Aplinkos veiksnių ir melžimo higienos įtaka pieno kokybei

Karvių fizinė būklė ir aplinka, kurioje karvės laikomos ir melžiamos, melžimo ir pieno laikymo įranga – veiksniai, nuo kurių priklauso žalio pieno mikrobiologinio užterštumo lygis. Žaliame piene, išmelžtame iš sveikos karvės tešmens, yra labai mažai mikroorganizmų – mažiau nei 100 000 kolonijas sudarančių vienetų (KSV) mililitre (ml). Bakterijos į pieną gali patekti iš pieno liaukos, nuo tešmens odos, iš aplinkos, nuo pieno laikymo ir šaldymo įrenginių. Taigi spenių ir tešmens paviršius su ant jų esančiais patogeniniais mikroorganizmais ir melžimo bei pieno laikymo įrenginių paviršiai yra pagrindiniai bakterijų atsiradimo piene šaltiniai. Karvių, kurių speniai yra nešvarūs, bendras bakterinis pieno užterštumas būna didesnis nei 100 000 KSV/ml. Jeigu piene koliforminių bakterijų yra arti 1000 KSV/ml, tai rodo, kad speniai prieš melžimą nebuvo tinkamai paruošti arba nešvarumai atsirado pienui besiliečiant su kitais paviršiais. Tokiu būdu į pieną patenka patogeniniai mikroorganizmai, sukeltys susirgimus žmonėms, kaip tuberkuliozė, bruceliozė, streptokokų ar salmonelių sukeltos infekcijos [14, 15]. Pagal patvirtintas Pieno supirkimo taisykles žalias pienas atitinka kriterijus, jei bendras bakterijų skaičius (BBS) 30 °C (viename ml) \leq 100 000, o somatinių ląstelių skaičius (SLS) (viename ml) \leq 400 000 [16].

Pieno kokybė tiesiogiai priklauso nuo aplinkos, kurioje yra laikoma karvė. Karvės oda yra vienas svarbiausių pieno užteršimo mikroorganizmais šaltinių. Tvartiniu laikotarpiu į pieną tiesiog iš karvių patenka 5–10 kartų daugiau bakterijų nei per ganiavą. Pakratuose būna įvairių bakterijų (pieno rūgšties, puvimo), mielių ir pelėsių. Daug dulkių, o kartu ir mikroorganizmų į tvartų orą patenka nuo stambiųjų pašarų, kurie dažnai užteršti. Pieną mikroorganizmais labai užteršia į jį patekę mėšlo gabalėliai, srutų lašeliai.

Mikroorganizmų šaltiniai karvės aplinkoje yra ir skraidantys bei ropojantys vabzdžiai. Ant musės kūno paviršiaus yra streptokokų, stafilokokų, puvimo bakterijų, mieliagyrybių, aktinomicetų. Ant melžėjų ir kitų pieno fermos darbininkų rankų, ypač panagėse, odos įtrūkimuose, žaizdelėse, visada yra įvairių bakterijų, net ir patogeninių. Gyvūnus aptarnaujantys darbuotojai gali susirgti įvairiomis infekcinėmis ligomis ir nešioti patogeninius mikroorganizmus [14]. Taipogi karvės tešmens odos sąlyčio su grindų paviršiumi metu mikroorganizmai yra pernešami ant tešmens ir vėliau patenka į pieną.

Pienas svarbus žmogaus mitybai ir sveikatai, šio maisto produkto patikimumas būtinas. Pienas iš sveiko tešmens turi natūralią mikrobiotą, tačiau gali būti užterštas patogeniniais mikroorganizmais, todėl yra būtina fenotipiškai iširti patogeninių mikroorganizmų profilį [15]. Tyrimo rezultatai

parodo, kad higienos efektyvumą galima įvertinti imant ėminius iš galvijų spenio kanalo. Nustatyta teigiama koreliacija tarp ant spenių odos ir spenio kanale esančių patogeninių mikroorganizmų skaičiaus [15]. Kliniškai sveikų galvijų 84,5 proc. spenių kanalų buvo kolonizuota bent viena patogeninių mikroorganizmų grupių, o *S. aureus*, *S. uberis* ir *E. coli* išskirta daugiausiai. Iš 72,2 proc. spenių kanalų išskirtas *S. aureus*. Autoriai nustatė, kad spenio galo pažeidimo intensyvumas hiperkeratoze balais teigiamai koreliuoja su *E. coli*, *S. uberis* kolonizacija spenių kanale [17]. Autorių teigimu, spenio odos bakterijos, spenio latako mikrobiota priklauso nuo pieno ūkių valdymo. Tinkamai prižiūrint karvių odą ir tešmenį mikroorganizmų skaičių piene galima sumažinti 10–20 kartų. Mikroorganizmų kolonizacijai spenio kanale įtakos turi gyvūnų aplinka, spenių odos priežiūra ir antiseptika bei melžimo aparatų suregulavimas. Dėl vakuumo svyravimų melžimo metu spenio kanalą kolonizuojantys mikroorganizmai gali įsiskverbti į galvijų pieno liauką ir ten sukelti infekcijas. Mechanizuotai melžiant pienas nuolat kontaktuoja su spenio oda ir bakterijos patenka į pieną. Vidinis melžimo įrangos ir pieno cisternos paviršius yra didelis ir gali išlaikyti dideles bakterijų populiacijas, teršiančias pieną. Nuoplovose, paimtose nuo 5 m² melžimo įrangos paviršiaus, randama 100 mln./ml bakterijų. Mikrokokai sudaro 10–16 proc., enterobakterijos – 0,8–30 proc., kitos gramneigiamos – 11–27 proc. ir sporas gaminančios aerobinės bakterijos – 0,5–3,6 proc. Taipogi sveiko tešmens pieno cisternoje ir kanaluose randama *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Listeria* gentčių mikroorganizmų, kurie į pieną gali patekti nuo gyvūno odos, melžėjų rankų, melžimo indų, iš oro [14, 18, 19]. Mbuk ir kitų bendraautorių [20] tyrimuose iš melžimo aparato ir pieno mėginių buvo išskirtos įvairių rūšių mielės. *Candida* genties mielės išskirtos daugiausiai (77 proc.) mėginių, tarp jų *C. rugosa*, *Candida catenula*. Paskelbti duomenys, kad didesnis *Enterococcus* genties bakterijų skaičius buvo susijęs su silosu racione, palaidu laikymu, su šiaudiniais pakratais, nepakankama melžimo higiena, o taip pat vyresnėmis karvėmis. Šis tyrimas dar kartą patvirtino, kad melžiamų karvių amžius, higiena, ūkininkavimo būdas turi įtakos kiekybinei ir kokybinei spenių odos mikrobiotos rūšinei įvairovei [21].

Berhe ir bendraautorių [22] teigimu per pieną plintančios patogeninės bakterijos yra apie 90 proc. visų su žalio pieno vartojimu susijusių žmonių ligų. Autorių teigimu *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ir *Campylobacter* spp. yra pagrindiniai patogenai žaliame piene. Taip pat Hohmann ir bendraautorių [17] tyrimais nustatyta, kad gramteigiamų bakterijų, ypač koagulazę gaminančių ir negaminančių stafilokokų, ant spenių odos buvo daugiausia, o laktobacilų, ente-

rokokų, gramneigiamų bakterijų, pelėsių ir mielių kiekis buvo mažesnis. Nustatyta, kad ant spenių odos yra stafilokokų, streptokokų ir gramneigiamų bakterijų santykiu 100:10:1, bet tai labiausiai priklauso nuo kraiko. Stafilokokų ir mielių buvo mažiau ant telyčių spenių odos. Šiuos teiginius išplečia E. Čereškienės [23] tyrimas, kuriame, apibendrinusi valstybinės įmonės (VĮ) „Pieno tyrimai“ duomenis, autorė teigia, kad pieno mikrobiota priklauso nuo bandos dydžio: didžiausiose pagal karvių skaičių bandose (daugiau kaip 200 karvių) daugiausia nustatyta mišri mikrobiota – 8,6 proc. ir *Staphylococcus* spp. – 6,9 proc. Net 72,7 proc. visų *E. coli* atvejų ir 60,8 proc. gramteigiamų lazdelių, 59,5 proc. *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) ir 46,5 proc. *S. aureus* atvejų buvo nustatyti 50–100 karvių bandose. Metų laikas keičia mikrobiotą ant spenio odos ir piene: žiemos laikotarpiu dominavo *Staphylococcus* spp. (21,6 proc.), *S. aureus* (21,6 proc.) ir *S. agalactiae* (13,5 proc.). Pavasarį daugiausiai buvo randama mišrios mikrobiotos (22,6 proc.), *S. aureus* (16,6 proc.), gramneigiamų lazdelių ir *Staphylococcus* spp. (13,6–13,9 proc.). Rudens laikotarpiu daugiausiai buvo nustatyta mišri mikrobiota (24,9 proc.), *S. aureus* (14,6 proc.) ir *Staphylococcus* spp. (14,1 proc.).

Spenio odos kolonizacija mikroorganizmais autorių apibūdinama kaip galima invazija į galvijų pieno liauką ir intramaminės infekcijos (IMI) rizika. Bakterijos į tešmenį patenka pro spenio kanalėlį, o vyresnių karvių šį kanalėlį uždarantys raumenys yra silpnesni negu jaunesnių, todėl mikroorganizmai pro jį į tešmenį patenka lengviau. Norint išvengti mastitą sukeliančių mikroorganizmų patekimo į pieno liauką, svarbu išlaikyti gerą spenių galų būklę. Tyrėjai nurodo, kad spenio kanalas ir spenio galo būklė vaidina pagrindinį vaidmenį patogenų patekimui į tešmenį. Spenio galo hiperkeratozė dėl nereguliuotų melžimo aparatų, sukelia spenių galų šiurkštumą ir padidina mastitą sukeliančių patogenų galimybę sukelti infekcijas. Yra nustatytas ryšys tarp klinikinio mastito atsiradimo ir spenio galo būklės. Tyrėjai siūlo kontroliuoti spenių galų būklę norint išvengti mastito. Mikroorganizmai tešmenyje kolonizuojasi spenio kanalėlyje ir spenio cisternoje, o alveolėse paprastai jų nebūna, nes jų veikimą slopina baktericidinės pieno medžiagos. Įvertinant šią aplinkybę, kai karvės palieka melžimo aikštelę, joms būtina turėti priėjimą prie šviežio pašaro ir vandens, taip skatinant jas stovėti 20–30 minučių, kol visiškai užsidarys spenio kanalas [1, 24, 25].

1.2. Aplinkos ir patogeninių mikroorganizmų įtaka tešmens sveikatingumui

Mastito atvejai aprašomi jau nuo 1942 m., tačiau didelio masto problema ši infekcija imta laikyti tik po keturių dešimtmečių, kai stambėjo karvių bandos, didėjo primilžis iš karvės. E. Čereškienės [23] duomenimis, ma-

žiausias pieno primilžis ir pieno riebumas nustatytas, kai piene identifikuotos mielės, o mažiausias pieno baltymingumas – nustačius G grupės *Streptococcus* spp. Nustačius *S. agalactiae* ir *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) piene rasta mažiausiai laktozės.

Mastitą 95 proc. atvejų sukelia *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *E. coli*, *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*) bakterijos ir *Candida* spp. mielės. Enterobakterijos, streptokokai ir enterokokai patenka į tešmenį iš aplinkos, kurioje laikomos karvės (gulėjimo vieta, mėšlas, dirvožemis). Dėl aplinkos patogeninių mikroorganizmų išsivysto 46 proc. mastito susirgimų, o daugelis iš jų sukeltų *E. coli* ar *Streptococcus* spp. gali pasireikšti klinikiniais simptomais [26–28]. Mikroorganizmai žaliaviniame piene, pavyzdžiui, *Campylobacter jejuni* ar *S. aureus*, gali sukelti susirgimų protrūkius žmonių tarpe. Kai karvės aplinkoje įsigali mieliagybiai, sudarantys bioplėveles, užkrato eliminacija iš bandos sudėtinga, gydymas apsunkintas [29, 30].

Lietuvoje kaip dažniausi mastitų sukėlėjai nustatyti mišri mikrobiota (23,8 proc.), *S. aureus* (15,3 proc.) ir *Staphylococcus* spp. (14 proc.). Pirmosios laktacijos karvių pieno mėginiuose dominavo mišri mikrobiota (26,5 proc.) bei gramneigiamos lazdelės (16,1 proc.), antraveršėms ir trečiosios bei vyresnių laktacijų karvėms – *S. aureus*. *S. agalactiae* paplitimas antrojoje laktacijoje buvo 2 kartus, o trečiojoje ir vyresnėse laktacijose – 3,3 karto didesnis nei pirmaveršių [23]. Tuo tarpu Suomijoje dažniausi mastito sukėlėjai: *Staphylococcus* spp. (43 proc.), *S. aureus* (21 proc.), *Streptococcus* spp. (17 proc.), *C. bovis* (7 proc.), *E. coli* (5 proc.) [31].

Literatūros duomenimis, *S. aureus* ir *S. agalactiae* dažniausi patogeniniai mikroorganizmai, kurių šaltinis yra užkrėstas tešmuo. Šie patogeniniai sukėlėjai karvių tarpe plinta melžimo metu per melžimo įrangą, pašluostes, nešvarias melžėjų rankas. Subklinikinių *S. aureus* sukeltų infekcijų trukmės mediana yra 64 ir 91 diena, o bakteriologinio išgijimo tikimybė yra maža. Nors šio sukėlėjo sukeltas mastitas pirmaveršėms retesnis nei vyresnėms karvėms, bet jis gali būti pagrindinė telyčių klinikinio mastito priežastis. Kaip užkrečiamas patogeninis mikroorganizmas melžiamų karvių bandose nustatytas ir *Staphylococcus hyicus* bakterija, kuria užsikrečiama per infekuotus tešmenis. *Staphylococcus chromogenes* įvardijama kaip labiausiai paplitusi koagulazės negaminančių stafilokokų rūšis (KNS), kuri padidina SLS piene [32–34]. *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Enterococcus* spp. dažniau užsikrečiama per aplinką ir infekuotus tešmenis, plinta melžimo metu. *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. užsikrečiama per aplinką, pakratus, mėšlą, dirvožemį. Net 21,9–34,7 proc. klinikinių karvių mastito atvejų sukelia aplinkos patogeninis mikroorganizmas *E. coli*. Taipogi atrajotojai yra natūralus verotoksiną gaminančios *E. coli*

(VTEC) rezervuaras, dėl to žmonėms sukelia hemolizinį-ureminį sindromą ir hemoraginį kolitą [15, 22].

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) ir *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) yra retai išskiriami iš mastitinio pieno, tačiau sukeltas jų infekcijas sunku gydyti. Mastitu sergančių karvių sergamumas *S. marcescens* yra nedažnas, atitinkamai 3,1–4,7 proc. *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) sukeltas galvijų klinikinis mastitas irgi retas, o subklinikinis mastitas gali būti ir neidentifikuotas. *C. bovis*, *Bacillus* spp. užkrečiama nuo infekuotų tešmenų, sunkiai gydoma net plataus spektro antibiotikais. *Arcanobacterium pyogenes* užkrečiama esant tešmens mechaniniams pažeidimams, plinta per muses. Šio sukėlėjo pažeidimų gydymas yra drastiškas, t. y. panaikinti pažeistą spenį [35, 36].

Mastitus gali sukelti ir grybeliai bei mielės, nors jie laikomi įprasta karvių aplinkos mikrobiota, tačiau gausiu bei netikslingu antibiotikų naudojimu dažnai sutrikdoma mikrobiotos pusiausvyra spenio kanale, tešmenyje, sudaromos sąlygos mielių ir grybelių dominavimui, kurie sukelia tešmens infekcijas. Šie mikroorganizmai randami ant karvės odos, kraike, patalpose, guoliavietėse, pašaruose ir net vandenyje bei melžimo įrangoje. Kaip etiologinis mastito faktorius dažniau nustatomas *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) ar *Candida* spp. bei *Aspergillus* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotrulosis* spp., *Geotrichum* spp., *Tolurlopsis* spp., *Saccharomyces* spp. ir retai – *Malassezia* spp. *C. neoformans* sukelia gana stiprų tešmens uždegimą ir yra pavojingas ne tik karvėms, bet ir žmonėms. Kandidozę sukeliančios mielės į spenio kanalą dažniausiai patenka dėl blogų higienos sąlygų. [27, 37–39].

Aplinkos mikroorganizmai, t. y. nešvari aplinka ir higienos trūkumas bandoje vaidina labai svarbų vaidmenį mastito etiologijoje [27, 28]. Labai agresyvus ir sunkiai kontroliuojamas aplinkos patogeninis mikroorganizmas *Prototheca zopfi* nustatytas kaip karvių mastito priežastis pienininkystę vystančiose pasaulio šalyse [27, 40, 41]. *Prototheca* genties dumbliui dauginantis pieno liaukoje ir regioniniuose limfmazgiuose išsivysto lėtinis granuliacinis uždegimas, pažeidžiama pieno liaukos parenchima, atrofuojausi užkrėsti tešmens ketvirčiai, sumažėja pieno primilžis, SLS padidėja daugiau nei 1 mln./ml [42, 43]. *Prototheca* mastitas dažniausiai atsiranda dėl sąlyčio su užterštu vandens šaltiniais ar įranga, o kai karvė užsikrečia, *Prototheca* spp. plinta melžimo metu ir per žindomus veršelius. Veiksmingų ar patvirtintų *Prototheca* mastito gydymo būdų nėra. Ligos sukėlėjo išnaikinimas iš bandos yra sudėtingas ir pagrįstai neįmanomas uždavinys, užkrėstos karvės turi būti pašalintos iš bandos, o ligos kontrolei lieka tik prevencinės priemonės, tokios kaip spenių antiseptika ir įrangos dezinfekcija [44].

1.3. Atsparių antibiotikams mikroorganizmų įtaka tešmens sveikatingumui ir pieno kokybei

Didelis mastito sukėlėjų atsparumas antimikrobiniais vaistams gali būti sietinas su mažai kontroliuojamu antimikrobinų vaistų skyrimu, pardavimu ir sunaudojimu [45]. Valstybinė maisto ir veterinarijos tarnybos 2021 m. pateiktame pranešime [46] nurodoma, kad Lietuvoje maistui auginamiems gyvūnams 2017 m. antimikrobinų vaistų teko 34,8 mg/kg biomasės (ES – 107,3 mg/kg biomasės), o per 2020 m. parduota 6,3 t antimikrobinų vaistų, iš jų 47 proc. skirti galvijų gydymui. Chiara Tommasoni su bendradarbiais paskaičiavo, kad maždaug 60–70 proc. visų antimikrobinų medžiagų, naudojamų pieninių galvijų fermose, skiriamos būtent mastito gydymui [47]. Lietuvoje populiariausi antimikrobiniai vaistai: amoksicilinas, sulfachlorpiridazinas, enrofloksacinas [46].

Netinkamo antimikrobinio vaisto skyrimas neatlikus mikrobiologinių tyrimų ir nepakankama gydymo dozė ne tik sutrikdo normaliosios mikrobiotos santykį pašariniame, bet ir lemia atsparių padermių atsiradimą ir plitimą. Skowron ir bendraautorė [28] duomenimis, *Listeria* spp., izoliuotos iš karvės pieno ir pieno produktų, buvo atsparios bent vienai antimikrobinei medžiagai, o 71,4 proc. iš pieno išskirtų *L. monocytogenes* padermių buvo atsparios kelioms antimikrobinėms medžiagoms.

Mastitu sergančios karvės per pieną platina vaistams atsparias mikroorganizmų padermes. Jų perdavimas vyksta per melžimo įrangą, pašarų, tešmens gydymo ir higienos priemonės, darbuotojus. Pienas su tokiomis bakterijomis kelia grėsmę ne tik vartotojams, bet ir aptarnaujančiam personalui [48, 49].

Breen ir bendraautorė [45] nuomone, mastito kontrolė tebėra pieno augintojų, veterinarijos gydytojų dėmesio centre dėl jos poveikio karvių sveikatai ir gerovei, pieno kokybei, tvariai gamybai ir finansinių išlaidų, susijusių su gydymu ir profilaktika. Kontroliuojamas antibiotikų naudojimas pienininkystėje (ypač naujų infekcijų prevencijai), ieškoma alternatyvių gydymo ir profilaktikos priemonių, kuriamos strategijos. Ilgalakis antibiotikų naudojimo mažinimas ir racionalizavimas mastito kontrolei pasiekiamas tobulinant vadybą, užkertant kelią naujoms infekcijoms ir taip išvengiant būtinybės gydyti mastitą. Tai pasiekama išsiaiškinus epidemiologinę infekcijos „modelį“ bandoje ir tikslingai įgyvendinant profilaktines priemones, siekiant sumažinti naujos infekcijos dažnį tiek laktacijos metu, tiek užtrūkimo laikotarpiu. Daugumoje pieninių bandų vyrauja aplinkos mastito sukėlėjai, todėl karvių laikymas, tvarka ir švara, melžimo higiena yra pagrindinės mastito kontrolės dalys, tuo pačiu mažinant antibiotikų naudojimo poreikį pienininkystėje.

1.4. Melžimo higienos įtaka pieno kokybei ir tešmens sveikatingumui

Karvių tešmens higiena turi įtakos bendrajam bakteriniam pieno užterštumui, nes kai speniai ir tešmuo yra nešvarūs, atsiranda galimybė bakterijoms patekti į tešmenį. Todėl ūkyje higienos praktikos vadyba turi būti organizuojama taip, kad išlaikytų sveiką karvės tešmens odą, sumažintų bakterijų kiekį spenio kanale ir aplink jį. Viskas, kas yra užteršta ir ką paliečia speniai, yra mikroorganizmų perdavimo kelias. Pagrindinis būdas sumažinti bakterijų skaičių ant karvės spenių odos yra efektyvi karvių spenių higiena. Labai svarbu, kad spenių galų antiseptika būtų atliekama taisyklingai [50, 51].

Praėjusio amžiaus septintajame dešimtmetyje JAV sukurtos mastito kontrolės programos [52], kurios pagrįstos karvių laikymo ir melžimo higiena, įskaitant spenių antiseptiką, gydymą antibiotikais ir nuolat užkrėstų karvių eliminavimu iš bandos. Šių priemonių priėmimas ir taikymas leido pasiekti didelę pažangą kovojant su mastito sukėlėjais. Tačiau tos pačios priemonės yra mažiau veiksmingos prieš aplinkos patogeninius mikroorganizmus [52]. Mastitą sukelia daug skirtingų patogeninių mikroorganizmų, todėl svarbus melžiamų karvių spenių panardinimas į atitinkamus baktericidinius preparatus prieš ir po melžimo, tokiu būdu sumažinant spenių odos kolonizaciją mastitą sukeliančiomis bakterijomis ir patogeninių mikroorganizmų prasiskverbimą į spenio kanalą [53–55]. Moksliniuose darbuose aprašyta per 300 eksperimentinių ir komercinių preparatų veiksmingumo tyrimų. Prieita prie išvados, kad spenių vilgymo produktų veiksmingumas buvo ženklus, nes sumažino sergamumą mastitu 50–95 proc. Dėl mastito atvejų sumažėjimo vien tik JAV pieninėse bandose sutaupyta milijonai dolerių per metus [50, 51, 56]. Autoriai pabrėžia, kad labai svarbu laikytis visų mastito kontrolės programos etapų, ypač stengiantis išlaikyti švarią ir sausą galvijų gyvenamąją aplinką ir tešmens higieną, naudoti antiseptines priemones prieš ir po melžimo [57–59].

Daugelyje mokslinių tyrimų vertintas spenių vilgiklių po melžimo veiksmingumas mastito profilaktikai. Nustatyta, kad spenio panardinimas po melžimo yra veiksminga priemonė apsauganti spenį nuo užkrečiamųjų ligų sukėlėjų bei padeda apsaugoti nuo aplinkos bakterijų, kol spenio anga užsidaro. Be to, ilgai naudojant vilgiklius nustatyta, kad mikrobiotos kiekybinė ir rūšinė įvairovė ant spenių odos kinta. Atlikus karvių spenių antiseptiką vien tik pamelžus, stafilokokų ir streptokokų sukeltų mastitų skaičius sumažėja 20–61,5 proc. [50, 57, 60].

Tyrimais patvirtinta, kad spenių vilgymas po melžimo yra veiksmingiausia melžimo higienos praktika siekiant užkirsti kelią naujoms infekcijoms bei labai (50–70 proc.) sumažina naujų IMI, ypač tų, kurias sukelia

užkrečiamojo mastito sukėlėjai, bei yra poveikis aplinkos patogeniniams mikroorganizmams [51, 57, 59]. Karvės, kurioms po melžimo buvo atlikta spenių antiseptika, rečiau užsikrėtė *S. aureus*, *S. uberis*, *Corynebacterium* spp. ir koagulazės negaminančiais stafilokokais, laktacijos metu buvo mažesnis SLS piene, o spenių odos anomalijų buvo mažiau, palyginti su karvėmis, kurių speniams nebuvo taikyta antiseptika vilgikliais ($p < 0,05$). Spenių antiseptika po melžimo daugelyje pasaulio šalių tapo mastito kontrolės programų kertiniu akmeniu. Pradžią davė JAV Nacionalinio pienininkystės tyrimų instituto penkių taškų mastito kontrolės plano įvedimas praėjusio amžiaus septintajame dešimtmetyje [50, 58, 61].

Mokslininkų [2, 3, 62] darbuose apibendrinta, kad higienos po melžimo priemonių naudojimo tikslas – užkirsti kelią mastitui ir užtikrinti gerą spenių būklę. Tai vienas svarbiausių mastito prevencijos ir kontrolės programos komponentų. Higienos po melžimo priemonės pašalina patogeniškus mikroorganizmus nuo spenių, yra užtikrinama apsauga, kad spenio kanalas bus apsaugotas nuo užkrėtimo, speniai yra drėkinami, greičiau užgyja žaizdelės ir įtrūkimai. Svarbu išsaugoti spenio mikrobiotą, nes spenių odos mikrobiotos vientisumo išsaugojimas yra potencialiai svarbus dėl jos vaidmens gyvūnų sveikatai bei gaminamų produktų iš pieno kokybei, technologijai [63]. Kamal ir bendraautorį, Böhm ir bendraautorį [62, 64] tyrimuose spenių mirkymą po melžimo naudojo labai užkrėstose bandose. Jie įrodė, kad tai labai veiksminga priemonė naujo mastito prevencijai, viena efektyviausių procedūrų, mažinančių subklinikinių ir klinikinių mastito atvejų skaičių laktacijos laikotarpiu. Rezultatai parodė, kad būtent veiklioji medžiaga turi įtakos spenių odos taršai bakterijomis. Skirtingos sudėties antiseptiniai tirpalai bakterijų rūšis veikė skirtingai. Tyrėjai akcentuoja, kad tirtų vilgiklių biocidinio efektyvumo skirtumų yra, svarbu parinkti tinkamą biocidą spenių higienai [60, 65]. Spenių vilgymo priemonės reikia rinktis tokias, kurios ne tik būtų efektyvios kovojant su patogeniniais mikroorganizmais, bet ir būtų ekonomiškos, lengvai taikomos ir palaikytų gerą odos būklę [1].

Tešmens sveikatingumą tausojantys antiseptiniai tirpalai padengia odą plona plėvele, ant spenio galo susidaro lašas, kuris neleidžia mikrobiotai pakliūti į spenio kanalą. Tai gerokai sumažina patogeninių mikroorganizmų kiekį, neleidžia tešmens odai džiūti ir trūkinėti. Priklausomai nuo ūkio higienos ir sanitarinės būklės bei tešmens paruošimo būdo, vilgiklių naudojimo po melžimo, žalio pieno bakterinė tarša gali sumažėti. Nickerson ir Olivier [50] teigimu, net 90 proc., o mastito atvejų – 50–75 proc. Lopez-Benavides ir bendraautorį [66] duomenimis, spenių antiseptika po melžimo taikoma 84 proc. bandų Jungtinėse Valstijose.

R. Mišeikienė [1] paskelbtame tyrime daro išvadą, kad naudojant spenių antiseptiką prieš melžimą ir po melžimo SLS sumažėjo beveik 2 kartus.

Gleeson ir bendraautorai [67] tyrime nustatė, kad pavienių ketvirčių SLS buvo skaičiai didesni nevilgytiems speniams, palyginti su vilgytais speniais ($p \leq 0,09$). Bendras nevilgytų spenių pieno užterštumas bakterijomis buvo reikšmingai didesnis nei pieno iš vilgytų spenių ($p \leq 0,10$). Tai sutampa su kitų autorių paskelbtais tyrimų rezultatais [68]. Spenių vilgymas po melžimo yra IMI prevencijos metodas, kuris sumažina mastito riziką, gamybos sąnaudas ir mažina neigiamą vaistų poveikį gyvūnams ir pieno vartotojams [69].

1.5. Tešmens higienos po melžimo ypatumai

Spenių antiseptikai po melžimo naudojami įvairūs purškalai, valikliai ir vilgikliai, kurie turi pasižymėti antimikrobiniu aktyvumu, gerai padengti spenio paviršių ir laikytis ant jo, nedirginti odos ir ją drėkinti. Tyrėjai ieško kuo natūralesnių, mažiau kenksmingų medžiagų, nepatenkančių į kraujotaką, nedidinančių inhibitorinių medžiagų kiekio [52, 70–74].

Pamelžtų karvių tešmens spenius būtina apdoroti antiseptiniu tirpalu ar tepalu, kurie išlieka iki kito melžimo. Ypač svarbu šiuos veiksmus atlikti kiekvienai karvei po kiekvieno melžimo ir nepraleisti nė vienos. Šios taikomos priemonės sumažina tikimybę mikroorganizmams plisti nuo vienos karvės kitai. Pamerkus į specialų antiseptinį tirpalą ant spenio galo susidaro šio tirpalo lašas, kuris apsaugo tešmenį nuo bakterijų. Vilgant spenius tirpalas turi būti šiltas. Sveiko spenio odos išsaugojimas yra būtinas, norint išlaikyti natūralią apsaugą nuo infekcijos. Skaudamuose, sausuose, sutrūkinėjusiuose speniuose pažeidžiamas odos barjeras, dėl ko patogeniniai mikroorganizmai sukelia mastitą. Žiemos sąlygos gali sukelti greitą dehidrataciją ir spenio audinio įtrūkumus, spenio oda skilinėja ir padidėja spenių galų hiperkeratozė, padidėja bakterijų kolonizacija spenių galuose, didėja SLS piene ir dar labiau padidėja rizika susirgti mastitu [50, 60].

Atlikus tyrimus didelėse bandose, baktericidinius produktus panaudojus purkštuvais, aerozolių balionėliais ar purškimo buteliais prieita prie išvados, kad ši procedūra, nepriklausomai nuo pasirinkto aplikacijos būdo, yra veiksminga, jeigu spenio oda visiškai padengiama produktu. Purškimas vyksta greičiau, tačiau palyginti su vilgymu sunaudojama daugiau produkto. Kad būtų toks pat efektyvus kaip spenių mirkymas, visas spenio paviršius turi būti padengtas čiuurkšle, deja, darbuotojai dažniausiai purškia tik vieną spenių pusę. Dėl to rekomenduojama mirkyti spenius, o ne purkšti, kad būtų suvilgytas visas spenių paviršius [75, 76].

Spenių vilgymo būdas panardinant į puodelį su vilgikliu reikalauja, kad tokio tipo aplikatorius būtų švarus ir neužterštas organinėmis medžiagomis. Nickerson [56] duomenimis, per vilgymo puodelius užteršimas mastito

sukėlėjais mažai tikėtinas, jei yra veiksmingas antiseptikas ir puodelis nėra užterštas, nors autorius pripažįsta, kad buvo atveju, kai spenių vilgikliai tapo mastito sukkelto *Pseudomonas* spp. ir *Serratia* spp. protrūkio priežastimi.

Spenių mirkymo produktai gali dirginti spenių odą, sukelti skilinėjimą, pažeidimus, išsausėjimą.

Kaip dirgiklis gali būti įvardijama ir pati antimikrobinės medžiagos cheminė sudėtis, per žemas arba per didelis pH, skilimo produktai, atsirandantys dėl produkto netinkamo temperatūrinio režimo, gamybos problemų, skiedžiant produktą ne pagal instrukcijas arba sanitarinių higienos normų neatitinkančiu vandeniu [50].

Esant itin šaltam orui, vėjuotoms sąlygoms spenių antiseptika atliekama pamerkiant tik spenio galą į baktericidinį tirpalą, perteklių nuvalant popieriniu rankšluosčiu. Siūloma naudoti miltelinį apsaugos būdą. Tyrimai parodė, kad spenių aseptika milteliais tokia pat veiksminga kaip vilgymas, SLS ženkliai sumažėja [76, 77].

JAV Nacionalinė mastito taryba (NMC) [78] nurodo, jog spenių antiseptika po melžimo yra veiksminga kovojant su patogeninės kilmės bakterijomis, nors pieno liaukoje jau esančioms infekcijoms įtakos neturi. NMC rekomenduoja po melžimo naudoti antiseptinius tirpalus tešmeniui ir speniams, net jei bakterijos buvo pašalintos ir somatinių ląstelių kiekis yra mažas, nes tolimesnis vilgiklių naudojimas pagerina tešmens fizinę būklę ir pieno kokybę. Teigiama, kad antiseptinių vilgiklių naudojimas išlieka viena iš pieno pramonės priemonių mastitui kontroliuoti [78, 79].

Po melžimo spenio anga lieka atvira, tuo metu patogeniški mikroorganizmai gali patekti į spenio kanalą ir sukelti infekciją. Norint užkirsti tam kelią yra naudojami vilgikliai, kurie veikia baktericidiškai, bakteriostatiškai, vilgiklio lašu uždaro spenio kanalą ir neleidžia patogeniškiems mikroorganizmais patekti į spenio kanalą.

1.6. Antiseptikai, biocidai ir dezinfektantai pienininkystėje

Antiseptinės priemonės, skirtos tešmens ir spenių antiseptikai, savo sudėtyje įprastai turi baktericidiškai veikiančią medžiagą, kuri sumažina patogeninių mikroorganizmų kiekį ant spenių odos. Antiseptikai neselektyviai veikia mikroorganizmų dauginimąsi, slopina ar juos naikina. Antiseptikos efektyvumas priklauso nuo cheminės medžiagos rūšies, koncentracijos, tirpalo temperatūros, ekspozicijos, mikroorganizmų rūšies, jų kiekio. Paprastai mikroorganizmus efektyviau veikia didesnės koncentracijos tirpalai. Antiseptikams keliami šie reikalavimai: geras mikrobiocidinis veikimas, greitas, ekologiškai švarus ir nekenksmingas veikimo efektas, ilga tirpalo veiksmingumo trukmė, nekenksmingas gyvūnui ir personalui. Antiseptikos

kokybė priklauso nuo gero sąlyčio su mikrobine ląstele, antiseptinės medžiagos savybių ir jos tirpalų patvarumo, infekcijos sukėlėjų skaičiaus ir jų atsparumo antiseptinėms medžiagoms, objektų paviršių užterštumo organinėmis medžiagomis (jos neutralizuoja antiseptiką), antiseptiko tipo ir koncentracijos, procedūros trukmės, antiseptinio tirpalo ir aplinkos temperatūros bei tirpalo pH [28].

Veterinariniams tikslams naudojamos antimikrobinės medžiagos yra dažniausiai jodo ir chlorheksidino turintys produktai ir natrio hipochloritas, pieno rūgštis, peracto rūgštis, vandenilio peroksidas, nes jie turi kumuliacinį poveikį. Ant karvės spenių jie išlieka aktyvūs iki 6 valandų [7, 80, 81].

Spenių vilgymui skirti produktai turi būti saugūs ir veiksmingi. Dezinfekantai, remiantis reglamento (ES) Nr. 528/2012 dėl biocidinių produktų tiekimo rinkai ir jų naudojimo V priedu [5], skirstomi į penkis tipus pagal paskirtį, tarp jų – ir 3-ias tipas – veterinarinės higienos biocidiniai produktai. Tokie biocidiniai produktai turi turėti platų veikimo spektrą prieš bakterijas, tačiau neturėtų neigiamai paveikti gyvūnų ar melžimo įrangos.

Antiseptinis tirpalas turi baktericidiškai veikti spenių odą, sumažinti naujų pieno liaukos uždegimų kiekį, neturėti neigiamos įtakos pienui, nepažeisti spenių odos, nebūti toksiškas ir gydyti spenių pažeidimus [69]. Dėl biocidinių produktų poveikio gali sutrikti žmonių ar gyvūnų sveikata, jos gali stipriai pakenkti aplinkai. Tam, kad būtų įvertinta biocidinio produkto sudėtis, veiksmingumas ir jo keliamo rizikai žmogui, gyvūnams bei aplinkai yra privaloma biocidinio produkto autorizacija. Neautorizuoti biocidiniai produktai negali būti tiekiami ir naudojami.

Norint tiekti į ES rinką biocidinius produktus būtina atlikti dviejų veiksmų procedūrą: veiklioji medžiaga, kurią planuojama naudoti gaminant biocidinį produktą ar apdoroti gaminį, turi būti patvirtinta ES lygmeniu (t. y. turi būti teigiamai įvertintas jos veiksmingumas ir saugumas) atitinkamam produkto tipui; kad biocidinį produktą būtų galima pateikti rinkai arba naudoti, jis turi būti autorizuotas nacionaliniu arba ES lygmeniu. Jei veiklioji medžiaga dar nepatvirtinta, bet įtraukta į peržiūros programą, biocidinis produktas gali būti teikiamas rinkai arba naudojamas laikantis nacionalinės teisės aktų reikalavimų. Be to, nuo 2015 m. rugsėjo 1 d. visi biocidiniai produktai gali būti teikiami rinkai tik tuo atveju, jei veiklioji medžiaga ir jos tiekėjas įtraukti į veikliųjų medžiagų ir tiekėjų sąrašą pagal ES Reglamento 528/2012 95 straipsnį [5].

Iš 2020 metais autorizuotų veterinarinės higienos dezinfekantų 73 proc. sudarė produktai melžiamų gyvūnų speniams dezinfekuoti, o 13 proc. – produktai melžimo įrangai dezinfekuoti. Spenių dezinfekcijai skirti biocidiniai produktai skyrėsi savo sudėtimi ir naudojimo būdu. Buvo autorizuoti penki biocidiniai produktai su chlorheksidinu bei šeši biocidiniai produktai su pieno

rūgštimi, tačiau tik vienas jodo pagrindu pagamintas biocidinis produktas. Lietuvoje yra autorizuoti biocidiniai produktai su jodu, skirti speniams dezinfekuoti. Todėl pieno rūgšties bei chlorheksidino turintys produktai yra puiki alternatyva jodui alergiškų gyvūnų speniams dezinfekuoti. Be to, biocidai su chlorheksidinu gali pagerinti bandos sveikatą tais atvejais, kai vyrauja jodui ir pieno rūgščiai atsparūs mastito sukėlėjai. Vertinant pagal naudojimo būdą buvo autorizuoti aštuoni produktai, skirti speniams dezinfekuoti po melžimo, du produktai – naudoti LELY melžimo robotuose užpurškiant ant spenių po melžimo bei du produktai – speniams apdoroti putomis prieš melžimą [82].

1.7. Spenių vilgiklių kūrimo principai

Teigiama, kad ilgalaikis vilgiklių naudojimas lemia mikrobiotos kiekybinės ir rūšinės įvairovės pokyčius ant spenių odos. Vis dėlto, ne visi rinkoje prieinami vilgikliai pasižymi pakankamu efektyvumu; kai kurie iš jų yra neefektyvūs, o kiti veiksmingi tik esant tam tikroms antimikrobinėms medžiagoms kartu arba veikia tik prieš tam tikras mikroorganizmų rūšis [1, 54].

Tirpalai po melžimo turi turėti antimikrobinį aktyvumą, gerai padengti spenio paviršių ir ant jo išsilaikyti, drėkinti nedirgindami odos. Todėl karvių spenių antiseptikai skirtuose produktuose turi būti antiseptinės medžiagos, odą saugančių komponentų ir klampumą formuojančios medžiagos. Spenių mirkymo tirpalai turi nekenkti gyvūnui ar aptarnaujančiam personalui. Tirpalai turi už dengti spenį ir ant paviršiaus išlikti tam tikrą laiką; turi būti tinkamo pH, kad nedirgintų odos; turi turėti drėkinamąjį poveikį, kad oda būtų minkšta, neįtrūkusi, o bet kokios nedidelės žaizdelės greičiau gytų [55, 83]. Antiseptikai, kurie naudojami karvių tešmenims po melžimo, turi pasižymėti baktericidiniu ir bakteriostatiniu veikimu, o įvairių veikliųjų medžiagų (pavyzdžiui biocinų ar augalinių priedų) naudojimas biociduose suteikia platų veiksmingumo spektrą [55, 83, 84].

Antiseptinis poveikis ir pakankamas sudaromos plėvelės storis ir vientisumas yra svarbūs biocidiniams spenių vilgikliams. Vienas svarbiausių reikalavimų spenių mirkymo tirpalams – klampumas. Užtepęs priemonę ant spenelių odos turi susidaryti ištisinė plėvelė, kurios paskirtis – spenelių kanalo apsauga nuo mastitą sukeliančių mikroorganizmų patekimo [9]. Tirpalų klampumą galima reguliuoti parenkant įvairaus tipo tirštiklius. Natūralios kilmės tirštikliai paplitę veterinarinės farmacijoje, maisto pramonėje [10]. Klampumas turi būti pakankamas, kad susidarytų nelašanti emulsija, kai spenių vilgiklis tepamas ant spenių odos. Klampumas yra svarbus fizikinis spenių mirkymo tirpalo parametras, atspindintis produkto kokybę [11, 85, 86]. Svarbi veterinarinių biocidų savybė yra ta, kad tirpalo formulės sta-

bilumas turi išlikti visą produkto galiojimo laiką [5]. Tai reiškia, kad spenių vilgiklis turi išlaikyti fizinių, cheminių savybių stabilumą. Dėl stabilumo stokos sumažėja antimikrobinės savybės.

Kuriant spenių vilgiklius svarbu, kad produktas nebūtų kenksmingas gyvūnui ir aplinkai. Todėl kuriant naujos formulės spenių vilgiklius atsižvelgiama į naudojamo tirštinio ir antimikrobinės medžiagos klasifikaciją pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 [87].

Kuriant naujus produktus su antiseptinėmis savybėmis daugiau dėmesio skiriama produkto ingredientams, jų sudėčiai. Stebimas didesnis susidomėjimas inovatyviomis produktų sudėtimis, ypač turinčiomis natūralių ingredientų, gaunamų iš ekologinių ūkių [73, 88, 89]. Svarbu, kad sukurtas produktas nesukeltų alerginio kontaktinio dermatito, odos deginimo pojūčio, niežulio [90]. Nors skirtingų dermatologinių preparatų sudėtis, poveikis skiriasi, tačiau, siekiant užtikrinti jų veiksmingumą, reikia parinkti tinkamas pagalbines medžiagas, leidžiančias išlaikyti aktyviųjų komponentų stabilumą bei tinkamą sąveiką su oda. Įvairių ingredientų įtaka yra nuolat tiriama siekiant sukurti veiksmingus vartoti produktus [4].

Ant odos naudojami preparatai turi nepažeisti odos. Tai ypač svarbu siekiant apsaugoti odą nuo patogeninių mikroorganizmų. Formuojant naujus produktus svarbu atsižvelgti į jų paskirtį ir numatomą poveikį. Antiseptinių medžiagų turintys produktai, skirti odai, turi išlikti ant odos paviršiaus, sudaryti apsauginę plėvelę, sumažinti odos dehidrataciją, todėl jų komponentai išlieka ant raginio sluoksnio ar įsiterpia į jį. Klasikinėje farmakologijoje įterpiančios vaistinės medžiagos ar aktyvūs ingredientai preparato pagalbinių medžiagų savybės turi užtikrinti vaistinės ar aktyviosios medžiagos stabilumą sistemoje bei tinkamą veikimą ir patekimą į poveikio vietą. Pirmiausia medžiaga turi difunduoti iš preparato ant odos paviršiaus [91, 92].

1.8. Spenių vilgiklių po melžimo sudėtinės medžiagos

Norint, kad vilgiklis būtų veiksmingas, reikia parinkti tinkamą sudėtį, medžiagų proporcijas ir įvertinti kokybės parametrus. Vilgiklių veikliosios medžiagos turi būti registruotos pagal Europos Biocidinių produktų direktyvą ir reikalavimus Lietuvoje [93].

1.8.1. Antibakterinės medžiagos vilgiklių sudėtyje

Antibakterinių medžiagų, įeinančių į vilgiklių po melžimo sudėtį, pagrindinis reikalavimas – baktericidiškai veikti patogeniškus ir aplinkos mikroorganizmus esančius ant spenio odos. Šią funkciją produktuose atlieka jodas, chlorheksidinas, chloras, pieno rūgštis, peroksidas ir kitos medžiagos, analogiškos kaip ir taikomos žmogaus odai. Apžvelgdami mokslinę literatūrą,

kurioje aptariama vietiniai antiseptiniai produktai, tyrėjai daro išvadą, kad nors nanotechnologinės formos įrodė privalumus, tačiau nepaisant to, vis dar yra galimybių kurti produktus iš tradicinių žaliavų ir juos tobulinti, optimizuoti [6, 55, 94].

1.8.1.1. Pieno rūgštis

Pieno rūgštis (jos druskos – *laktatai*), yra nedidelės molekulinės masės organinė rūgštis, dalyvaujanti įvairiuose biocheminiuose procesuose. Pieno rūgštis susidaro natūralios fermentacijos metu kefyre, rūgpienyje, sūriuose, jogurte, sojos padaže, raugintose daržovėse. Pieno rūgštis yra natūraliai aptinkama žmogaus ir gyvūnų organizmuose. L-pieno rūgšties izomeras pasižymi žemu pH ir yra stiprus dirgiklis. Organinių rūgščių antibakterinis aktyvumas yra paremtas nedisocijuotos rūgšties formos gebėjimu prasiškerbti per ląstelių membraną ir disocijuoti ląstelės viduje. Dėl to mažėja pH reikšmė ląstelėje, kuri yra būtina adenozino trifosfato (ATP) sintezės kontrolei, ribonukleino rūgšties (RNR) ir baltymų sintezei, deoksiribonukleino rūgšties (DNR) replikacijai ir ląstelių augimui. Įrodyta, kad pieno rūgšties produktai turi antibakterinį aktyvumą prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas [68, 95, 96].

Pieno rūgštis kartu su kitomis medžiagomis vilgiklyje suformuoja plėvelę kaip barjerą, neleidžiantį mikroorganizmams patekti į spenių kanalą. Autoriai teigia, kad tokiu būdu spenio kanalas yra apsaugomas nuo galimų infekcijų ar uždegimų [7]. Kai kurių tyrimų duomenimis, spenių mirkymo tirpalai, kuriuose yra 5 proc. pieno rūgšties, turi pastebimą antimikrobinį poveikį prieš *E. coli*, slopino *Shigella* spp., *S. enteritidis* ir *L. monocytogenes* augimą [97], o Fitzpatric ir kiti [54] tyrime nustatytas streptokokų padermių augimo sumažėjimas 70,1 proc.

Tiriant vilgiklių su pieno rūgštimi antibakterinį veiksmingumą nustatyta, kad pieno rūgšties koncentracija vilgikliuose svyravo nuo 1,76 proc. m/m iki 8 proc. m/m. Vilgikliai su 5 proc. m/m pieno rūgšties sumažino streptokokų skaičių 70,1 proc. Vilgiklis su 2 proc. pieno rūgšties ir 0,6 proc. m/m chlorheksidino buvo 100 proc. efektyvus prieš stafilokokus. Vilgiklis, kurio sudėtyje yra 1,6 proc. m/m pieno rūgšties ir vandenilio peroksido, sumažino streptokokų ir stafilokokų skaičių atitinkamai 89,9 proc. ir 59,4 proc. [54]. Šis tyrimas rodo, kad kai kurie spenių antiseptikai skirti produktai specifines bakterijų grupes, izoliuotas nuo spenių odos, veikia skirtingai. Taip pat svarbu, kad tyrimai dėl sumažėjusio jautrumo pieno rūgšties spenių antiseptinėms priemonėms dar nepaskelbti [98, 99].

Yra poreikis ieškoti natūralesnių alternatyvų, kurios gali būti naudojamos kartu arba pakeičiant esamus cheminius junginius. Kai kurios pieno

rūgštį išskiriančios bakterijų padermės, tokios kaip *Lactococcus* spp. gamina niziną – bakteriociną, kuris paveikus prieš gramteigiamas bakterijas. Bakteriocinai buvo pasiūlyti naudoti spenių vilgikliuose, pakeičiant įprastinius komercinius tirpalus. *Lactococcus* spp. pagrindu pagaminto preparato naudojimas parodė panašų veiksmingumą kaip komercinės dezinfekavimo priemonės, užkertant kelią naujoms IMI ir palaikant tešmens sveikatą [74]. Kitame tyrime karvių, apdorotų laktobacilų ar jodo pagrindu pagamintais vilgikliais, SLS piene buvo panašus. Gauti duomenys, kad laktobacilų turinčiu vilgikliu galima apsaugoti spenio kanalą ir tešmens sveikatingumą [25]. Ekologiški produktai mastito profilaktikai svarbūs dėl gyvūnų ir žmonių sveikatos.

1.8.1.2. Chlorheksidinas

Chlorheksidinas yra sudarytas iš dviejų simetriškų 4-chlorofenilo žiedų ir 2 guanidino liekanų, centre sujungtų heksametileno tilteliu. Chlorheksidinas gali būti 3 formų: digliukonatas (tirpus vandenyje), acetatas (tirpus vandenyje), hidrochloridas (mažai tirpus vandenyje) [100]. Chlorheksidinas pasižymi plačiu antibakteriniu veikimu prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas, anaerobus, aerobus ir mieles, bet nesunaikina sporų, grybelių bei tuberkuliozės mikobakterijų, poliovirusų ir adenovirusų [101, 102]. Chlorheksidinas yra mažai toksiškas, plačiai naudojamas kaip antibakterinė ir antiseptinė medžiaga [60]. Chlorheksidinas, kaip sudėtinis produkto komponentas, vartojamas daugiau nei 60-yje skirtingų vaistinių ar kosmetinių preparatų. Plačiai naudojamas dėl savo saugumo, plataus antimikrobinio poveikio spektro, stabilumo bei patogaus naudojimo ant odos, be to, chlorheksidinas lieka ant odos [101, 103]. Gyvūnams chlorheksidinas naudojamas vietinei žaizdų antiseptikai ir odos infekcijoms gydyti. Kuriami tepalai, geliai, skirti veterinariniams tikslams, turintys antibakterinio aktyvumo ir terapinio efektyvumo [104]. Antiseptiniai produktai chlorheksidino pagrindu naudojami pieno ūkyje [99, 105]. Pateiktame tyrime [28] chlorheksidinas parodė didesnę veiksmingumą prieš gramteigiamas bakterijas, be to, chlorheksidinas buvo efektyvus prieš *S. aureus* ir *L. monocytogenes*.

Chlorheksidinas turi teigiamą elektros krūvį, yra hidrofobinė ir lipofilinė molekulė, sąveikauja su fosfolipidais ir lipopolisacharidais, kurie randami bakterijos ląstelės membranoje. Tokiu būdu chlorheksidinas aktyvaus ar pasyvaus transporto mechanizmais patenka į ląstelę [106]. Esant fiziologiniam pH chlorheksidino druskos disocijuoja ir išskiria teigiamo krūvio chlorheksidino katijoną. Baktericidinis poveikis atsiranda dėl šios katijoninės molekulės prisijungimo prie neigiamo krūvio bakterijų ląstelių sienelių. Esant mažoms chlorheksidino koncentracijoms tai sukelia bakteriostatinį poveikį;

esant didelėms koncentracijoms, membranos pažeidimas lemia ląstelių mirtį. Chlorheksidino digliukonato antibakterinis poveikis priklauso nuo tirpalo pH reikšmės, o esant pH reikšmei tarp 5,5 ir 7,0 šis poveikis yra optimalus [101]. Pagal Karpinski ir bendraautorius [107] bakteriostatinis veikimas nustatytas esant mažoms chlorheksidino koncentracijoms (0,02–0,06 proc.). Tada chlorheksidinas pakeičia bakterinės ląstelės osmosinį balansą ir skatina mažos molekulinės masės molekulių (kalio, fosforo ir kt.) išsiskyrimą iš ląstelės. Esant didelėms chlorheksidino koncentracijoms (0,12–0,2 proc.) nustatytas baktericidinis veikimas. Chlorheksidinas gali sukelti ląstelių citolizę, didindamas ląstelės membranos pralaidumą įvairioms molekulėms. Maisto ir vaistų agentūra (FDA) rekomenduoja vartoti 0,12–0,2 proc. chlorheksidino koncentracijos skalavimo skysčius, vietinio vartojimo gelius ar purškalus. Tačiau antimikrobinis chlorheksidino poveikis skirtingoms bakterijoms prie tam tikro pH yra nevienodas. Esant aukštesnei pH reikšmei antimikrobinis poveikis yra prieš *S. aureus* ir *E. coli*, bet neženklaus prieš *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Skirtingų koncentracijų chlorheksidino junginiai pasižymi skirtingu poveikiu skirtingoms bakterijų rūšims [100].

Abbaszadegan ir kitų [108] tyrime nustatyta, jog chlorheksidino minimali slopinanti koncentracija prieš aerobus yra 14,17 µg/ml, anaerobus – 13,22 µg/ml, o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) – 18,75 µg/ml. 1 proc. chlorheksidino gelis yra efektyvus net 82,14 proc. atvejų prieš *E. coli*. Chlorheksidinu galima atlikti gyvūnų odos antiseptiką, šios rūšies preparatai plačiai paplitę karvių tešmens higienai prieš ir po melžimo [9]. Po melžimo naudojant higienos priemones, kuriose yra chlorheksidino, anot autorių, tešmuo apsaugomas nuo įvairių uždegimų ir mikroorganizmų, galinčių patekti į spenio kanalą. Kaip teigia Cieplik ir kiti [109], esant didelėms koncentracijoms (> 0,1 proc.) CHD sukėlė visų pagrindinių tarpląstelinį komponentų nutekėjimą iš ląstelės, todėl atsirado baktericidinis poveikis. Esant mažoms koncentracijoms (0,02–0,06 proc.), CHD sukėlė kalcio jonų (Ca^{2+}) ir magnio jonų (Mg^{2+}) išstūmimą, taip pat kalio jonų (K^+) praradimą iš ląstelės sienelės, todėl atsirado bakteriostatinis poveikis. Esant didelėms koncentracijoms (> 0,1 proc.) CHD sukelia visų pagrindinių tarpląstelinį komponentų nutekėjimą iš ląstelės ir sukelia baktericidinį poveikį.

1.8.1.3. Jodas

Jodo junginiai kaip antiseptinės ir dezinfekcinės priemonės naudojamas nuo XIX amžiaus. Jodas lengvai prasiskverbia pro mikroorganizmų ląstelių sienelės, suardo nukleino rūgščių ir baltymų struktūrą bei sintezę. *In vitro*

jodo junginiai turi baktericidinį, mikobaktericidinį, antivirusinį poveikį, o naudojant ilgesnį laiką sunaikina grybelius ir bakterijų sporas [13, 110, 111].

Jodo povidonas yra stabilus cheminis polivinilpirolidono ir elementinio jodo kompleksas. Jame yra nuo 9,0 proc. iki 12,0 proc. jodo, šį unikalų kompleksą 1955 m. Filadelfijos pramoninės toksikologijos laboratorijose atrado H. A. Shelanski ir M. V. Shelanski. Jie atliko bandymus *in vitro*, nustatė antibakterinį aktyvumą, toksiškumą pelėms bei patvirtino geresnį veikimą nei jodo tinktura [112].

Jodo povidonas veikia baktericidiškai, fungicidiškai, sporocidiškai, protozoocidiškai ir virucidiškai dėl mikroorganizmų gyvybinių struktūrų jodavimo ir oksidacijos, kai jodas atsipalaiduoja iš polivinilpirolidono ir jodo komplekso. Labiausiai paplitęs 10 proc. vandeninis jodo povidono tirpalas, taip pat dažnai naudojamas geliuose, nes sudaro plėvelę [113].

Jodas ir jo junginiai plačiai pritaikomi ir veterinarinėje medicinoje. Vienas plačiausiai paplitusių naudojimo būdų – karvių spenių antiseptika prieš ir po melžimo proceso [114, 115]. Vilgiklių su jodu kompozicijų privalumus – ryški ruda jodo suteikiama spalva, dėl kurios antiseptikas yra lengvai pastebimas ant odos.

Silva kartu su bendraautoriais [116] tyrė karvių speniams naudojamų antiseptinių priemonių veiksmingumą. Tikslas buvo įvertinti *in vitro* vilgiklio su jodu veiksmingumą prieš koagulazės negaminančius stafilokokus (KNS). Tyrimo išvadoje paskelbta, kad stipriausią *in vitro* antibakterinį poveikį koagulazės negaminantiems stafilokokams turėjo vilgikliai, kuriuose buvo 0,375 proc., 0,5 proc. ir 1,0 proc. jodo esant 60 sekundžių poveikio trukmei.

Ingawa ir kiti [117] įvertino, kad gelis su 0,5 proc. jodo žymiai sumažino mikroorganizmų kiekį, esantį ant spenių galų. Tyrime spenių vilgiklių, sudėtyje turinčių 0,25 proc. ir 1,0 proc. jodo, ekspozicijos laikas 30 sekundžių buvo toks pat veiksmingas, kaip 45 sekundžių ekspozicijos laikas. Sumažinus ekspozicijos laiką iki 15 sekundžių baktericidinis poveikis buvo mažesnis. Gleeson ir kiti [67] nenustatė jokių reikšmingų skirtumų tarp jodo, chloro, chlorheksidino ar alkoholio naudojimo sumažinant spenių odos užterštumą koliforminėmis bakterijomis. Böhm ir kiti [64] tyrime vertino penkias skirtingas jodo koncentracijas spenių vilgikliuose (250; 500; 1000; 2000 ir 3000 ppm) ir nenustatė reikšmingų skirtumų tarp jodo koncentracijos mažinant spenių odos mikroorganizmų kiekį. Rezultatus paaiškino laisvo jodo kiekiu tirpale. Jų teigimu, laisvas jodas yra atsakingas už antimikrobinį veikimą. Tiek žemesnė, tiek aukštesnė koncentracija nebūtų naudinga, nes 250 ppm spenių antiseptikos priemonė buvo tokia pat veiksminga, kaip 3000 ppm spenių antiseptikos priemonė. Martins ir kiti [80] tyrimuose patvirtinta, kad spenių antiseptikos po melžimo priemonė, turinti barjerinių savybių ir didesnę laisvojo jodo kiekį, sumažina klinikinio mastito riziką.

Aktyvus jodas yra molekulinio jodo koncentracijos matas, kuris yra labai reaktyvus ir todėl baktericidinis. Laisvasis jodas yra vienintelė jodo forma, turinti įrodytą koreliaciją tarp koncentracijos ir baktericidinio aktyvumo produkte. Produktas, turintis didelę (12–16 mg/kg) laisvojo jodo koncentraciją, sumažino IMI 55 proc., palyginti su mažesniu (5–8 mg/kg) laisvo jodo turinčiu produktu.

Phillips ir kiti [118] paskelbė tyrimo rezultatus, kad laktuojančių karvių spenių pamirkymas 0,1 iki 0,5 proc. jodo tirpaluose sumažino IMI sukkelto *S. aureus* 63,3–88,2 proc. Teigiama, kad vilgiklio su jodu lašas spenio gale baktericidiškai veikė *S. aureus* ir užkirto kelią naujų IMI tarp telyčių ir laktuojančių karvių. Skowron su bendraautoriais [28] tyrė jodo, stabilizuoto jodo, povidono jodo ir chlorheksidino efektyvumą mastitą sukeliančioms bakterijoms. Bakterijų skaičiaus sumažėjimas panaudojus antiseptines priemones buvo labai didelis (> 90 proc.). Jautriausi naudotiems preparatams buvo *L. monocytogenes* (99,6–99,9 proc.). Stabilizuotas jodas buvo veiksmingiausia priemonė visoms tirtoms bakterijoms, dėl kurios bakterijų skaičius sumažėjo nuo 99,80 proc. (*E. coli*) iki 99,99 proc. (*S. aureus*, *L. monocytogenes*). Cabeça ir kiti [119] pranešė apie mažą jodo efektyvumą *L. monocytogenes* padermėms, kurios formuoja bioplėveles (2,0 log KSV/ml).

Apibendrinus vilgiklių efektyvumą kontroliuojant mastitą nustatyta, kad vilgikliuose jodo pagrindu optimaliausia aktyviosios medžiagos koncentracija – 0,5–1,0 proc. [120]. Tokiuose produktuose esantis jodas ar kompleksiniai jodo junginiai gali sukelti spenių odos dirginimą. Dėl šios priežasties į daugelį vilgiklių kompozicijų įeina odą drėkinantys komponentai. Vilgikliai jodo pagrindu turi būti naudojami tik tada, kai gyvūno oda yra švariai nuplauta ir nusausinta, ant jos neturi būti pieno likučių. Tyrėjai nustatė, kad mažos jodo koncentracijos (25, 30 ir 80 ppm) neefektyvios prieš stafilokokus, bet sumažina bendrą bakterijų skaičių 30–80 proc. Tuo tarpu 200 ppm koncentraciją efektyvi mažinant stafilokokų, koliforminių ir BBS. Antiseptinės medžiagos, kurių veikiamoji medžiaga yra chlorheksidinas (koncentracija 0,35 proc.), jodoformas (0,1 proc. ir 0,25 proc. koncentracijos), mažina patogeninių stafilokokų kiekį. Atlikus karvių spenių antiseptiką 0,1–0,5 proc. jodoformo tirpalu pamelžus, stafilokokų ir streptokokų sukeltų mastitų skaičius sumažėjo 20–61,5 proc. [121].

Tyrimuose [122, 123] teigiama, kad grybelių ir mielių dauginimosi galima išvengti, jei naudojama melžimo įranga yra kruopščiai plaunama karštu 50 °C ir aukštesnės temperatūros vandeniui, speniai yra gerai nuplunami ir mirkomi jodo tirpale, kuris turi fungicidinį poveikį.

Krukowski ir bendraautorai bei Salerno ir bendraautorai [124, 125] tyrė dumblių *Prototheca zopfii*, išskirtą iš karvių pieno. Tyrimo tikslas buvo įvertinti poveikį chlorheksidino ir jodo *P. zopfii* padermėms, nes įprastinis

antimikrobinis ir priešgrybelinis gydymas nepasiteisina. *In vitro* tyrimai parodė, kad chlorheksidino ir jodo biocidų taikymas melžimo aparatams ir speniams padeda išvengti dumblių sukeltų infekcijų.

Jodo antiseptinės plėvelės svarba buvo išmatuota naudojant *in vitro* spenių modelį su skirtingais barjeriniais produktais. Nustatyta, kad ilgiau išsilaikanti apsauginė plėvelė sumažino infekcijos dažnį 30 proc., o didesnis laisvojo jodo kiekis ir apsauginė plėvelė IMI atvejų skaičių sumažino 21 proc., lyginant su paprasta spenių antiseptika po melžimo [80].

1.8.2. Klampą reguliuojančios medžiagos

Vilgiklis turi gerai padengti spenį, nenubėgti ir nesudaryti per storo sluoksnio. Klampą reguliuojančios medžiagos suteikia vilgikliams tinkamą konsistenciją, dėl to tirpalas išsilaiko ant spenio reikiamą laiką. Pamerkus spenį, ant odos sukuria apsauginę plėvelę, kuri apsaugo spenio kanalą nuo patogeninių mikroorganizmų. Spenių vilgymo produktuose naudojami natūralūs ir dirbtiniai tirštikliai. Klampumą galima reguliuoti pasirenkant skirtingų tipų tirštiklius ir jų skirtingas koncentracijas [54, 81, 86]. Produkte gali būti naudojamos ir paviršiaus aktyvumo medžiagos, kurios produktui suteikia homogeniškumą, pavyzdžiui, polisorbatus 20, polisorbatus 10, polisorbatus 80 ar kitos. Jie taip pat padeda išlaikyti vilgiklio stabilumą, gerina reologines savybes [10, 11].

1.8.2.1. Guaro lipai

Iš kampuotosios pupenės (lot. *Cyamposis tetragonoloba*) sėklų (pupenių) gaminamas pupenių tirštiklis, pupenės sėklų lipai, kurių pagrindinė medžiaga yra galaktomananas – medžiaga, sudaranti drebučius. Ši medžiaga yra naudojama maisto, farmacijos, popieriaus, tekstilės, kosmetikos ir kitose šakose. Šis produktas pasižymi stingdančiomis ir tirštinančiomis savybėmis, suteikia gaminiui klampumo, lėtina ledo kristalizaciją. Vos 1 proc. pupenių miltelių labai padidina produkto klampą. O lėta ledo kristalizacija ir produkto struktūros stabilumas net keičiantis užšalimo ir tirpimo ciklams leidžia užšaldyti gaminius ir juos saugiai atšildyti. Kampuotoji pupenė išsaugo ir atkuria odos lipidų sluoksnį, drėkina ir stangrina odą [126, 127].

Guaro lipai gali būti naudojama kompozicijose kaip tirštiklis arba kaip kompoziciją stabilizuojantis agentas. Ši medžiaga – tai hidrofiliųjų karbohidratų kompleksas, kurio struktūra yra artima polimerams. Struktūrą sudarantys galaktozės fragmentai β -1,4-glikozidiniu ryšiu yra prijungti prie grandinės suformuotos iš manozės fragmentų. D-galaktozės fragmentai tarpusavyje yra susijungę 1,6-gliozidiniu ryšiu [128].

Polimero grandinę apsupus vandens molekulėms prie manozės prisijungę galaktozės fragmentai sąveikauja su vandens molekulėmis ir sudaro intra-molekulines grandines, kurios nulemia tirpalo tirštėjimo procesą. 1 proc. vandeninis guaro lipų tirpalas gali pasiekti 10 000 mPa·s klampą. Guaro lipų tirpumas ir klampos sudarymo laipsnis didėja mažėjant dalelių dydžiui, pH ir kylant temperatūrai [129]. Svarbiausia šio tirštiklio charakteristika – gebėjimas išbrinkti ir suteikti tirpalui klampą žemoje temperatūroje. Tirpalai, kurie ruošiami aukštoje temperatūroje su šiuo tirštikliu, pasiekia maksimalią klampą greičiau nei ruošiami žemoje temperatūroje. Tačiau per ilgas aukštos temperatūros poveikis gali sukelti guaro makromolekulių destrukciją ir stebėsime klampos mažėjimo efektą. Guaro lipai yra stabilūs plačiame pH reikšmių intervale, kai tirpalai yra laikomi kambario temperatūroje. Stabilumas kintant pH intervalui siejamas su nejoniniu krūvio veikimo mechanizmu. Greitas tirštumo sumažėjimas pastebimas rūgštinėje terpėje, esant aukštai temperatūrai [130]. Guaro lipai atlieka ne tik tirštiklio, bet ir apsauginės plėvelės sudarymo, emulsiklio, stabilizatoriaus vaidmenį kuriamuose produktuose [131].

1.8.2.2. Ksantano lipai

Ksantano lipai – didelės molekulinės masės polisacharidas, kurį angliavandenilių fermentacijos metu išskiria bakterijos *Xanthomonas campestris*. Pramonėje ksantano polimeras yra gaunamas iš bakterijų aerobinės fermentacijos proceso metu. Ksantano lipų polimerinė grandinė yra sudaryta iš β-D-gliukozės fragmentų, susijungusių 1,4-glikozidiniu ryšiu. Prie kas antro β-D-gliukozės fragmento prisijungusi trisacharido šoninė grandinė. Šią šoninę struktūrą sudaro du manozės fragmentai, tarp kurių įsiterpė gulurono rūgšties fragmentas [11, 132].

Ksantano lipai yra tirpūs aukštos ir žemos temperatūros vandenyje. Medžiaga į vandeninį tirpalą turi būti dedama intensyviai maišant, tokiu būdu išvengiama sausų darinių susiformavimo, kurie prailgina tirpalo paruošimo laiką [133]. Šio polimero tirpalai pasižymi unikalios savybe išlaikyti stabilius klampos parametrus keliant temperatūrą. Ksantano lipų tirpalai yra jautrūs aukštoms ir žemoms pH reikšmėms. Dėl ypatingos ksantano lipų struktūros šis polimeras yra plačiai pritaikomas daugelyje sričių, ksantano derva yra naudojama produktų klampai didinti. Ksantano lipai yra ypatingi tuo, kad gali būti naudojami produktuose, kuriuose yra iki 50 proc. alkoholio, jos savybes gerina kalcio druskų priedas [85, 132]. Mokslinėje publikacijoje teigiama, kad produkto klampos reguliavimui pasirinkus ksantano polimerą galima ne tik sukurti geromis reologinėmis savybėmis pasižymintį produktą, bet ir pagerinti produkto struktūros vientisumą, švelnumą. Didinant polimero

koncentraciją tirpale pastebėta, jog pH reikšmė nekinta. Literatūroje teigiama, kad ksantano lipai gali būti svarbus ingredientas asmens sveikatos priežiūros ir biocidinėse priemonėse [11, 134]. Dažniausiai tokio pobūdžio priemonėse ksantano lipai naudojami produkto plėvelei sudaryti ant odos paviršiaus ir taip neleisti mikroorganizmams prasiskverbti į gilesnius odos sluoksnius. Pasižymi pakankamai mažu klampos pokyčiu plačiose temperatūrinėse ribose. Stabilu plačiose pH ribose. Tinkama naudoti, kai yra dideli druskų ir paviršinio aktyvumo medžiagų kiekiai. Gaminant produktus reikalingi maži kiekiai 0,2–1 proc. Nustatyta, kad ksantano lipų norma, palyginti su kitomis dervomis, yra maža, o atlikus tyrimus su graužikais nebuvo nustatyta, kad ksantano derva būtų toksiška [132].

1.8.3. Odą drėkinančios medžiagos

Drėkinančios medžiagos naudojamos tam, kad karvių speniai nebūtų šiurkštūs ir sausi. Taip speniai apsaugomi nuo papildomų įtrūkimų (jie yra dar vienas kelias patogeniškiems mikroorganizmams patekti į galvijo organizmą ir sukelti ligą), be to, kai palaikoma tinkama spenių drėgmė, žaizdelės greičiau gyja.

Riebalinių liaukų yra palyginti nedaug spenių odoje. Dažnas spenių plovimas, šaltis, vėjas gali pašalinti apsaugines riebalų rūgštis ir sukelti odos įtrūkimus. Dėl šių priežasčių, minkštikliai kaip lanolinas ar glicerolis, naudojami spenių vilgikliuose. Tokiais komponentais gali būti propilenglikolis, sorbitolis, alavijas ir kitos medžiagos. Kai kuriuose preparatuose surinkama alavijo ir alantoino, tai natūraliai augaluose, bakterijose ir gyvūnuose randamos medžiagos, kurios, kaip įrodyta, saugo, ramina ir kondicionuoja odą, turi odą gydančių savybių. Dėl šių savybių panaudojamos tvariuose gaminiuose [8, 25].

Glicerolis – tai bespalvis, bekvapis, aliejingas, klampus skystis, turintis saldų skonį, labai higroskopiškas. Maišosi su vandeniu ir 96 proc. etanolio, šiek tiek tirpsta acetone, praktiškai netirpsta riebaliniuose aliejuose ir eteriniuose aliejuose. Glicerolis yra stabilus esant kambario temperatūrai ir nedideliems temperatūros svyravimams, nes esant 54 °C temperatūrai gali skilti. Tai pagalbinė medžiaga, kuri gali atlikti šias funkcijas produkte: antimikrobinis konservantas, tirpiklis, minkštiklis, drėkiklis, plastifikatorius, saldiklis [135, 136]. Glicerolis drėkina raginį odos sluoksnį, didina elastingumą, apsaugo nuo išorės dirgiklių ir gerina žaizdų gijimą. Yra duomenų, jog glicerolis gali veikti antimikrobiškai [137].

Propilenglikolis – tai pagalbinė medžiaga, kuri gali atlikti šias funkcijas produkte: antimikrobinis konservantas, dezinfekantas, minkštiklis, drėkiklis, tirpiklis, stabilizuojanti medžiaga. Pagal mokslinės literatūros duomenis,

gana dažnai medžiagų skvarbai įpro odą tyrinėti tirpikliu pasirenkamas propilenglikolis, nes jame tirpsta daugelis vaistinių medžiagų ir jis nesukelia odos dirginimo [138–140].

Sorbitolis – organinis junginys, gliukozės redukcijos produktas: H(CHOH)₆H. Tai natūralios kilmės maisto priedas, natūralus angliavandenis alkoholis, esantis daugelio vaisių bei uogų sudėtyje, taip pat ir žmogaus organizme. Turi savybę išlaikyti drėgmę. Naudojamas kaip drėkiklis, emulsiklis, saldiklis, stabilizatorius [141].

1.8.4. Augaliniai ekstraktai ir eteriniai aliejai spenių vilgiklių sudėtyje

Augaliniai ekstraktai yra plačiai naudojami pasaulyje ir turi didelės reikšmės ne tik žmonių, bet ir gyvūnų sveikatai [142, 143].

Kaip aprašo Rasool su bendraautoriais [73], spenio kanalo apsaugos po melžimo teorija atsirado 1916 m., kai buvo naudojamas ananasų aliejus sumažinti *S. agalactiae* išplitimą. Šiuolaikiniuose tyrimuose nustatyta, kad augaliniai priedai vilgikliuose sumažina subklinikinio mastito kiekį, apsaugo nuo naujų IMI, pagerina pieno gamybą. Autoriai nurodo, kad eteriniuose aliejuose yra daug ingredientų, kurie turi antibakterinių, antioksidacinių savybių ir yra saugūs naudoti ant spenių odos. Taip pat nėra paskelbta apie išsivysčiusį antibakterinį atsparumą naudojamiems eteriniams aliejams.

Fitoterapiniai preparatai neturi šalutinio poveikio, neturi išlaukos, jie nesukelia bakterijų atsparumo. Gydymui ar profilaktikai tinka eteriniai aliejai, žolelių tinktūros ar augaliniai ekstraktai. Augalinės kilmės priedai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis ir turi antimikrobinį veikimą *B. cereus*, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, meticilinui atsparioms *S. aureus* (MRSA), *Edwardsiella* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Flavobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Candida* spp. padermėms [144]. Augalų gydomosios savybės priklauso nuo to, kiek ir kokių veiklių medžiagų (alkaloidų, flavonoidų, glikozidų, raugų, eterinių aliejų, vitaminų, pektinų, mineralinių medžiagų, organinių rūgščių) jie kaupia. Dėl minėtų savybių augaliniai priedai panaudojami ir spenių anti-septikuose. Tuo tikslu tiriama eterinių aliejų, probiotikų, augalinių ekstraktų galimybės ir nauda šioje srityje [70, 71, 145]. Chaisri ir bendradarbių teigimu [72], augalinių komponentų naudojimas spenių vilgikliuose gali ženkliai sumažinti antibiotikų naudojimą pienininkystėje, tokiu būdu sumažinant patogeninių bakterijų atsparumą antimikrobinėms medžiagoms ir antibiotikų likučius piene. Teiginius pagrindžia savo tyrimu, kuriame ciberžolės ekstraktas kartu su vandenilio peroksidu veiksmingai mažino SLS piene. Šie tyrimai parodo, kad galima plačiau naudoti augalines medžiagas. Autoriai

tikisi, kad ateityje bus galima augaliniais antiseptikais palaikyti pieninių galvijų produktyvumą ir užtikrinti maisto saugą, išlaikyti pieno kiekį ir kokybę [145]. Todėl reikalingi tyrimai, kad suprasti natūralių medžiagų potencialą užtikrinant melžiamų karvių tešmens sveikatą [88].

Vaistinių medetkų (*Calendula officinalis* L.) žiedai, literatūros šaltinių duomenimis, kaupia didelius kiekius karotenoidų (iki 3 proc.). Daugiausiai aptinkama β -karoteno (iki 30 mg%) bei randama ksantinių (violaksantino, riboksantino, flavoksantino), likopino ir neolikopino ir kitų veikliųjų medžiagų [146–148]. Sudėtyje esantys flavonoidai, o ypač kvercetas, turi priešūždegiminį poveikį, kuris slopina nedidelių odos žaizdų infekcijas, sumažina niežulį, paraudimą, patinimą, skausmą, vabzdžių įkandimų žalą, bėrimą, pragulas, ramina odą nudegus saulėje, subraižius, išsausėjus ar suskilinėjus. *In vitro* atliktų mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad *Calendula officinalis* L. pasižymi antibakteriniu, antimutageniniu, antioksidaciniu, baktericidiniu poveikiu prieš *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*). Medetkų ekstraktas veikia fakultatyvines aerobines ir anaerobines bakterijas *in vitro*, dėl sudėtyje esančių eterinių aliejų veikia kai kurių rūšių grybelius. Šis efektas sulyginamas su amfotericino B ir nistatino efektu. Priešgrybeliniu poveikiu pasižymi 10 proc. metanoliniai medetkų ekstraktai. Gydomojoje praktikoje medetkų žiedų fitoliai veikia antiseptiškai ir priešūždegimiškai [149–152].

Mėtų eterinis aliejus, išgautas iš *Mentha Arvensis* L., turi specifinį kvapą ir skonį, sukiantį šalčio pojūtį. Pagrindinė sudedamoji dalis – ciklinis terpenas mentolis (33–55 proc.). Jis sąveikauja su šalčiui jautriais TRPM8 receptoriais odoje, kurie atsakingi už vėsinamojo poveikio jutimą. Farmacijoje mentolis naudojamas kaip antiseptinė, vėsimo jausmą sukianti ir niežėjimą mažinanti medžiaga [153].

Vaistinės ramunės (*Matricaria recutita*) 0,05 proc. eterinis aliejus veikia gramteigiamas bakterijas (*S. aureus*, *B. subtilis*) ir gramneigiamas bakterijas (*E. coli*, *P. aeruginosa*), taip pat ir *C. albicans*. Antibakterinis efektas priklauso nuo chamazuleno, bisabololio ir bisabololio oksido kiekio, esančio eteriniame aliejuje. Nustatyta, kad ramunių hidroalkoholinis ekstraktas stabdo *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, B grupės *Streptococcus* bei *Streptococcus salivarius* augimą [154, 155]. Vaistinės ramunėlės flavonoidai – apigeninas, liuteolinas – absorbuojasi į gilesnius odos sluoksnius, tai rodo, kad vaistinė ramunėlė gali būti naudojama uždegimui gydyti gilesniuose odos sluoksniuose. Stimuliuoja regeneracinius procesus, gerina epitelizaciją ir odos granuliaciją. Tyrimas parodė, kad, lyginant su kortikosteroidais, ramunė yra efektyvesnis žaizdas gydantis agentas [156–159]. Išoriškai ramunių žiedų preparatai yra naudojami dermatologijoje gydant derma-

tozę, tinka saulės nudegintai, nušalusiai, įtrūkusiai odai, esant pūlinėms odos ligoms, sumušimams, vabzdžių įkandimams, įvairiems išbėrimams, infekcijoms, sunkiai gyjančioms žaizdoms gydyti [160, 161].

Kaštono (*Aesculus hippocastanum L.*) žaliavų ekstraktų biologinį poveikį lemia įvairių grupių biologiškai aktyvūs junginiai [162, 163]. Įrodyta, kad priešedeminį ir vazoprotekcinį paprastųjų kaštonų vaisių poveikį lemia β-escinas: slopina uždegimą, mažina patinimą, pasižymi venotoniniu poveikiu [164]. Paprastųjų kaštonų žaliavų ekstraktai turi karščiavimą mažinančių savybių, mažina skausmą, gerina odos elastingumą [165, 166].

Sėjamosios avižos (*Avena sativa L.*) sėklose, daiguose yra baltymų, skaidulų, mineralų, vitaminų, amino rūgščių ir antioksidantų (beta karoteno, polifenolių, chlorofilo ir flavonoidų) [167]. Avižų sėklų ekstraktai pasižymi dideliu priešgrybeliniu aktyvumu [168]. Kim ir bendraautoriai [169] teigia, kad avižose esanti avenakozidazė ir flavono glikozido funkcinės medžiagos kontroliuoja uždegimą odoje. Krakmolo ir beta gliukanų koncentracija avižose yra atsakinga už jų apsaugines ir vandens sulaikymo funkcijas, padeda sumažinti odos sausumą, pleiskanojimą ir niežėjimą, teikdamos intensyvų drėkinimą. Tyrimai parodė, kad avižos gali padidinti odos drėgmės lygį, moduluodamos jungiamųjų baltymų ekspresiją.

1.8.5. Kitos pagalbinės medžiagos

1.8.5.1. Izopropilo alkoholis

Izopropilo alkoholis (propan-2-olis, izopropanolis, 2-propanolis, IPA) – bespalvis, degus cheminis junginys su stipriu aromatu. Cheminė formulė C_3H_7OH . Izopropilo alkoholis – mažos molekulinės masės ingredientas, jis skatina kitų medžiagų patekimą į odą, gerai maišosi su kitomis cheminėmis medžiagomis, kurios turi panašias chemines struktūras. Ši izopropilo alkoholio savybė leidžia jį naudoti ištirpinant daugelį organinių junginių, kurių kiti tirpikliai, pavyzdžiui, vanduo, negali ištirpinti. Izopropilo alkoholis (IPA) farmaciniuose preparatuose naudojamas kaip tirpiklis bei kaip dezinfekcinė ar antiseptinė priemonė, nes tai užkerta kelią mikroorganizmų proliferacijai ir augimui. Tačiau jis dirgina odą, gali sukelti kontaktinį dermatitą [170, 171].

1.8.5.2. pH reguliuojančios medžiagos

Natrio hidroksidas – balti arba beveik balti kristalai, plokštelės arba granulės, lazdelės. Labai gerai tirpsta vandenyje, 96 proc. etanolyje. Naudojamas kaip pagalbinė medžiaga, atliekanti šias funkcijas: šarminanti medžiaga, buferinė medžiaga [138, 172, 173].

Citrinos rūgštis yra organinė rūgštis, kuri randama įvairiuose vaisiuose, naudojama maisto ir gėrimų pramonėje dėl savo antioksidacinių savybių

maistui konservuoti arba kaip rūgštinimo priemonė, pagerina skonį ir aromata. Farmacijos pramonėje ji naudojama kaip antioksidantas vitaminams išsaugoti, pH korektorius, konservantas. Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos (FAO)/Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) maisto priedų ekspertų komitetas patvirtino, kad citrinos rūgštis pripažįstama kaip saugus produktas [174]. Dėl savo sekvestruojamojo poveikio, pvz., askorbo rūgšties stabilizavimo ir gero buferinio pajėgumo, citrinos rūgštis ir jo druskos plačiai naudojamos farmacijos pramonėje kaip buferinę sistemą sudarančios ir palaikančios farmacinio produkto veikliųjų medžiagų stabilumą.

1.8.5.3. Dažikliai

Dažikliai vilgikliuose reikalingi tuo atveju, jei veiklioji antiseptinė medžiaga ar sudėtyje naudojamos kitos medžiagos nesuteikia aiškiai matomos spalvos. Kai vilgiklio sudėtyje naudojami dažikliai arba spalvą suteikianti veiklioji medžiaga (pvz., jodas), tuomet aiškiai matoma, ar vilgiklis gerai padengė spenį, ar yra jo likučių ant spenio prieš melžimą. Tai įgalina kontroliuoti, ar sėkmingai vykdomas vienas iš mastito prevencinės programos etapų [175]. Spalva turi įtakos produktų atpažinimui ir priimtinumui, nes tai yra jutiminių pojūčių atspindys.

1.9. Vilgiklių kokybės ir stabilumo vertinimas

1.9.1. Stabilumas

Vienas svarbiausių kuriamo produkto kokybės reikalavimų – preparato stabilumo ir saugumo užtikrinimas gamybos, saugojimo ir naudojimo metu. Yra nustatyti bendri reikalavimai pusiau kietų vaistų formoms, t. y. produktai turi būti reikiamos konsistencijos, kad būtų galima kokybiškai užtepti ant odos; vienalytiški; išlikti stabilūs saugojimo metu (saugojimo ir naudojimo metu sudėtis neturi kisti); reikiamas kiekis veikliosios medžiagos; geros tepumo savybės, lengvai paimamos iš indo, lengvai ir lygiai pasiskirstytų [55]. Chang ir kiti [176] paskelbtame straipsnyje nurodė rekomenduojamus produktų, skirtų naudoti ant odos, testus, kurie gali būti naudingi vertinant produktų kokybę (organoleptinių savybių tyrimas, vizualinio homogeniškumo įvertinimas, nustatant pH, įvertinant produkto konsistenciją ir pan.). Dauguma šių bandymų nėra reglamentuojami kaip privalomi, tačiau rekomenduojami siekiant patikrinti ir patvirtinti modeliuojamo gaminio kokybę. Gamintojas atlikdamas stabilumo tyrimus nustato gaminio tinkamumo naudoti laiką. Farmakopėje nurodoma, kad modeliuojamoms farmacinėms formoms yra svarbu organoleptinis patikrinimas, fizinis stabilumas, konsistencijos pokytis, spalvos pasikeitimas, kvapo pokytis [177].

Farmakologinio produkto stabilumas parodo technologinių gamybos procesų efektyvumą, sudedamųjų dalių įtaką produkto kokybei. Sumodeliuotų produktų kokybės tyrimai užtikrina, kaip produktas išlaiko savo fizinį vientisumą bei fizikinį ir mikrobiologinį stabilumą per visą jo galiojimo laiką [178]. Produktų kokybei įvertinti atliekamas centrifugavimo testas, patikrinamas tvirtumas ir farmacinės vaisto formos stabilumas, kurį įrodo fazių atsiskyrimo ar suskystėjimo nebuvimas mechaninio įtempio sąlygomis [179]. Vizualinis produkto homogeniškumo testas gali būti naudingas siekiant užtikrinti, kad preparate nebūtų fazių atsiskyrimo, sinerezės (vandens išstūmimo iš gelio) ir jokių pašalinių medžiagų. pH gali turėti įtakos vaistinės medžiagos stabilumui. Rekomenduojama nustatyti preliminarų 24 mėnesių galiojimo laiką, jei pateikiami atitinkami stabilumo duomenys pagreitintomis sąlygomis. Neturint priimtinių stabilumo duomenų pagreitintomis sąlygomis, kambario temperatūros stabilumo duomenys naudojami siūlomam preliminariam galiojimo terminui pagrįsti [176].

1.9.2. Tekstūra

Tekstūra – produkto fizikinių ir cheminių savybių rinkinys. Tai produkto mechaninės, geometrinės ir paviršiaus savybės, juntamos mechaniniais, lytėjimo ir net klausos receptoriais [180]. Tekstūros analizės yra naudojamos norint nustatyti produkto savybes: kietumą, trapumą, tepumą, lipnumą, tempiamąjį stiprumą ir tamprumą įvairiuose gaminiuose. Šios analizės atliekamos naudojant bazinius, empirinius ir imitacinius bandymus, susijusius su medžiagų mokslu ir kietų, pusiau kietų, klampių skysčių ar kitų medžiagų reologija. Tekstūros analizė pirmiausia pradėta naudoti maisto pramonėje, o vėliau – kosmetikos, farmacijos srityse, siekiant iširti gaminių mechanines savybes, kurios yra susijusios su jų juslinėmis savybėmis. Tekstūros profilio analizę (TPA) kaip tinkamą metodą pusiau kietoms vaistų farmacinėms formoms apibūdinti iš pradžių pasiūlė Jones su bendradarbiais apie 1997 m. Mokslininkų tyrimuose tirti mechaniniai parametrai, tokie kaip kietumas, lipnumas ir suspaudžiamumas bei jų koreliacija su terapiniu rezultatu ir, žinoma, vaisto farmacinės formos [181]. Vaisto farmacinės formos tekstūros savybės yra svarbus parametras optimizuojant vietinio naudojimo preparatus. Šios savybės turi įtakos preparato pritaikymui naudojimo vietoje ir gydymo rezultatams. Įprastai tekstūros analizė atliekama naudojant tekstūros analizatorius. Gana paprastas metodas suteikia tiesioginę informaciją apie gaminio rišlumą, lipnumą ir kietumą [182, 183].

Pagal Gupta ir kiti [184], vietinio odos pažeidimo gydymo tikslas yra sukurti pažangias sistemas, galinčias užtikrinti glaudų ir ilgalaikį vaisto formos ir pažeistos odos ploto kontaktą. Produktas turi būti lipnus, elastingas,

patvarus ir nepralaidus bakterijoms. Farmacinės formos, skirtos naudoti ant odos, turi turėti optimalias mechanines savybes – tepumą, biologinį sukibimą (ilgą sąlyčio laiką naudojimo vietoje), priimtina klampumą, veikliųjų medžiagų išsiskyrimą, o farmakologinio produkto lipnumas tiesiogiai paveiks gydymo rezultatus. Autoriai nurodo, kad sklandus tepimas ant odos yra kokybiško preparato bruožas. Šiuo tikslu sutelkiamas dėmesys į produkto mechanines ir tekstūros savybes. Tekstūros analizė atliekama griežčiau apibrėžtomis ir kontroliuojamomis sąlygomis. Dažniausiai tiriamos mechaninės farmacinio produkto savybės, susijusios su produkto reagavimu į spaudimą. Nustatomas mėginių kietumas, kuris parodo mėginio tvirtumą: kuo šio dydžio skaitinė vertė didesnė, tuo mėginys kietesnis. Konsistencija – pagal šį rodmenį galima spręsti apie mėginio tankumą, tirštumą, kuo ši vertė didesnė, tuo mėginys tirštesnis, tankesnis. Vertinant rišlumą arba koheziją parodoma kohezijos jėga – kuo didesnė kohezijos jėga, tuo mėginys lipnesnis. Šis rodiklis yra labai svarbus, nes vienas pagrindinių vilgikliams keliamų reikalavimų – gerai laikytis ant spenio, sudaryti plėvelę. Klampos indeksas parodo mėginio atsparumą atsiskyrimui, nubėgimui ir priklausomybę nuo temperatūros poveikio – kuo didesnė ši vertė, tuo reikia didesnės jėgos mėginiui suardyti, mėginys nenubėgs nuo spenio, bus mažesni klampos pokyčiai veikiant temperatūrai, susidarys pakankamo storio plėvelė. Yra matuojami ir kiti parametrai, kaip stangrumas, tamprumas, kibumas, adheziškumas, trapumas, tąsumas [185]. Atliekamas tepumo (angl. *spreadability*) testas, kuriuo įvertinama mėginių tekstūra, nustatant tvirtumo ir šlyties jėgos reikšmes, kurios leidžia apibūdinti mėginių pasiskirstymą ant paviršių. Mėginių tvirtumas ir šlyties darbas didėja, kai didėja sukibimo jėgos preparato mėginio viduje (padidėja molekulių sąveika). Kuo didesnis mėginių tvirtumas ir šlyties jėga, tuo mėginys ilgiau išliks poveikio vietoje. Analizuojamos ir produktų geometrinės savybės, susijusios su dalelių dydžiu, forma ir jų išsidėstymu produkte, t. y. grūdėtumas. Paviršiaus savybės yra susijusios su pojūčiais, kuriuos sukelia drėgmės ir (arba) riebalų kiekis, nustatomas drėgnumas [186].

Kiti tyrėjai taip pat analizavo farmacinių formų mechanines/reologines savybes, galimybes keičiant sudedamųjų dalių koncentraciją, formulės pH reikšmę ir priedų buvimą įvertinti parametrus, susijusius produkto rišlumu, lipnumu ir kietumu [187, 188]. Tekstūra yra svarbi kokybei, turi įtakos produktų išvaizdai ir galiojimo laikui. Įprastai farmacijos, kosmetikos, maisto pramonėje taikomi tekstūrų analizės metodai kaip kokybės kontrolės dalis tiek naujų produktų kūrimo, tiek gamybos etapuose, atliekami įvairūs matavimai, kad būtų išanalizuotos žaliavos ar pagalbinės medžiagos [189].

1.9.3. Antimikrobinių medžiagų skvarbos į odą tyrimai

Oda yra pagrindinis išorinis organas, kuris saugo nuo aplinkos įtakos, kenksmingų antigenų ir chemikalų, dehidratacijos, ultravioletinių spindulių. Oda suteikia struktūrinį vientisumą bei yra sudėtinga biologinė struktūra, dalyvaujanti ląstelių signalų perdavime, metabolizmo ir baltymų sintezės procesuose bei gyvybiškai svarbiuose nervų, imuninės ir endokrininės sistemos komponentuose [190]. Sudėtinga odos struktūra paverčia ją efektyvia išorine gynybos linija nuo išorinių veiksnių ir padeda palaikyti vidinę organizmo homeostazę. Ši vaidmenį atlieka epidermio barjeras su raginiu sluoksniu [191]. Ant odos naudojami vietinio poveikio antiseptiniai, anti-grybeliniai, antibakteriniai, priešuždegiminiai, vietiskai anestezuojantys vaistai bei odą minkštinantys ir ją apsaugantys preparatai ir kosmetinės priemonės. Ant odos naudojami preparatai veikia odą bei skverbiasi į gilesnius odos sluoksnius. Odos raginis sluoksnis yra barjeras, selektyviai pralaidus vaistams prasiskverbti į odą [192, 193]. Viršutinis odos sluoksnis *stratum corneum* atlieka odos barjero funkciją, ne visos medžiagos gali jį praeiti. Viena iš skvarbą skatinančių medžiagų – vanduo, o taip pat etanolis, padidinantis odos raginio sluoksnio pralaidumą, ekstrahuodamas odos lipidus ir baltymus. Be to, lengviau skverbiasi mažesnės ar turinčios hidrofobinių ir hidrofilinių savybių veikliųjų medžiagų molekulės [194, 195].

Europos alternatyvių metodų patvirtinimo centro išleistas protokolas [196] nusako, kaip vertinamas vaistinių medžiagų pralaidumas į odą. Jame nurodoma, kad būtina pakeisti su gyvūnais atliekamus *in vivo* testus į testus su izoliuota oda [197, 198]. Vartotojų produktų mokslinis komitetas yra išleidęs rekomendacijas, kaip vertinti kosmetikos produktų prasiskverbimą į odą *ex vivo* [199]. Rekomendacijose difuzinių celių metodas nurodomas standartiniu, be to, šis metodas lengvai atliekamas ir vertinamas, nes kintamieji yra tik du (oda ir tyrinėjama medžiaga). Pagal šias rekomendacijas, vaistinių medžiagų atpalaidavimui tyrinėti naudojamos įvairių konstrukcijų difuzinės celės (Franz, Hanson, VanKel, Mutimer). Šiuo metodu *ex vivo* nustatomas vaistinių medžiagų atpalaidavimas iš produktų, pagal išsikeltus tikslus galima parinkti modeliujamo produkto sudėtį. Tyrimų metu gauti rezultatai parodo bei leidžia interpretuoti vaistinių medžiagų skvarbą iš produkto į odą *in vivo* atveju.

Vaistinių medžiagų skvarbos į odą tyrimams *ex vivo*, nepriklausomai nuo medžiagos struktūros, gaunami ekvivalentiški rezultatai, tyrimams naudojant pratakias difuzines sistemas. Medžiagų skvarbai į odą *ex vivo* tyrime naudojama izoliuota oda. Jos kilmė gali būti pasirenkama: žmogaus, kiaulių, žiurkių, pelių, jūrų kiaulyčių, gyvačių ar dirbtinė. Odos storis gali svyruoti nuo 200 iki 600 μm su poodžiu ar be jo. *Ex vivo* eksperimentuose izoliuota

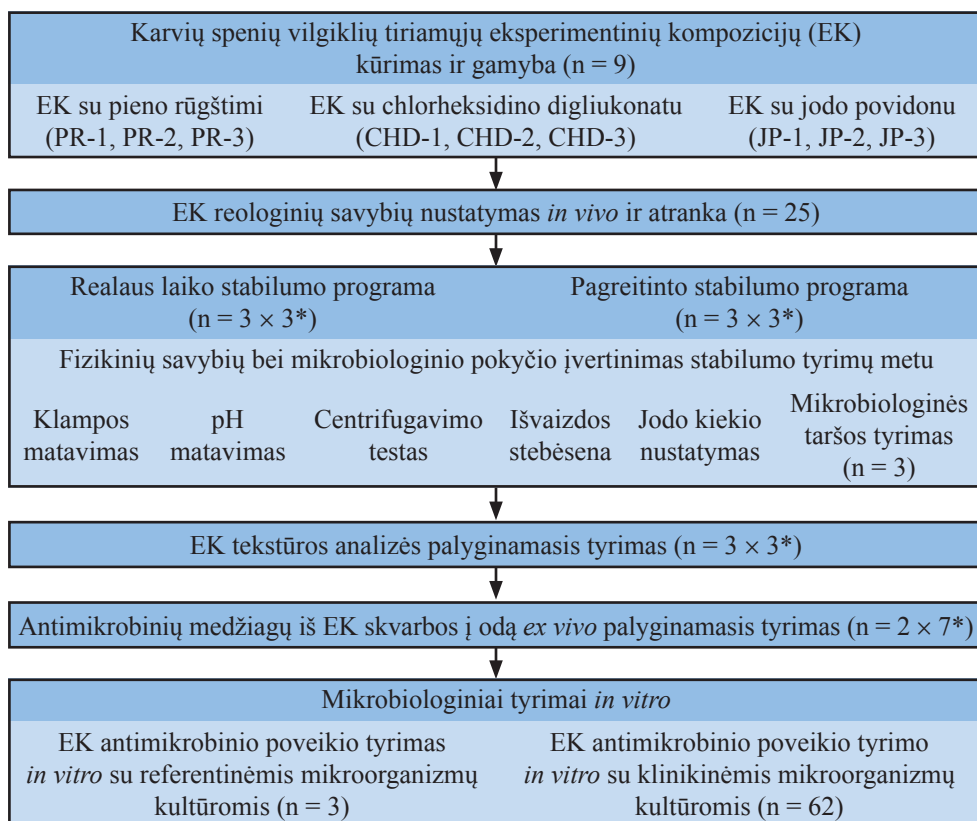
oda (žmogaus, gyvūno ar dirbtinė) dedama tarp dviejų difuzinės celės segmentų. Eksperimento metu vyksta medžiagų atpalaidavimas iš vaisto formosnešiklio ir jų skverbimasis pro odą į akceptorinę terpę, palaikant 32 °C odos temperatūrą [200, 201]. Tyrimas trunka iki 48 val., per kurias imami akceptorinės terpės mėginiai, kuriuose nustatomas prasiskverbusios per odą medžiagos kiekis. Po viso tyrimo ekstrahuojama oda ir prasiskverbusi medžiaga nustatoma odoje ir jos sluoksniuose pasitelkiant chromatografijos metodus ir pritaikant tinkamus jų detekcijai būdus.

Tyrėjai, kurie kuria išorinio naudojimo preparatus, pabrėžia svarbų aspektą, kad renkantis gaminio sudedamąsias dalis būtina atsižvelgti į jų skverbimosi į odą charakteristikas ir gebėjimą išlikti ant odos paviršiaus. Naudojant *ex vivo* tyrimo metodą, galima optimizuoti vietinio poveikio spėnių vilgiklių sudėtis, atrenkant tas sudedamąsias dalis, kurios neskatina skvarbos ir neįsiskverbia į gilesnius odos sluoksnius [199].

2. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGOS

2.1. Tyrimų atlikimo vieta, laikas, etapai ir tyrimo planas

Eksperimentinė tyrimų dalis buvo atlikta 2017–2024 metais UAB „Ruvera“ naujų produktų kūrimo ir tyrimų laboratorijoje (Šiauliai, Lietuva), komerciniame pieno ūkyje (Šiaulių regionas, Lietuva), Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU) Veterinarijos akademijos (VA) Mikrobiologijos ir virusologijos institute (Kaunas, Lietuva), Chelab S. R. L. laboratorijoje (Resana, Italija), LSMU Farmacijos fakulteto laboratorijoje (Kaunas, Lietuva) ir Nacionalinės visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje (NVSPL) (Vilnius, Lietuva). Tyrimai atlikti laikantis mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų (Nr. B1-866, 2012) [202]. Gyvūnų savininkas buvo supažindintas su vykdomu tyrimu ir jo tikslu, gautas jo sutikimas dalyvauti tyrime. Tyrimo planas pateiktas 2.1.1 pav.



2.1.1 pav. Tyrimo planas

* – kartotų matavimų skaičius tyrime.

2.2. Vilgiklių eksperimentinių kompozicijų (EK) kūrimas ir gamybos metodika

Vilgiklių EK sukurtos pagal literatūroje pateiktus duomenis, sudedamųjų medžiagų gamintojų rekomendacijas, gamyboje dirbančių specialistų pastabas bei atsižvelgiant į ankstesnių gamybinių bandymų duomenis.

Tyrimams buvo panaudotos trys skirtingos antimikrobinės medžiagos (pieno rūgštis, chlorheksidino digliukonatas ir jodo povidonas) ir buvo sukurtos ir pagamintos tolimesniems tyrimams 9 EK, t. y. po 3 skirtingas EK kiekvienai antimikrobinei medžiagai.

EK su **pieno rūgštimi** buvo sukurta naudojant pieno rūgštį, odą minkštinančias medžiagas, augalinius ekstraktus, dažus ir klampumą reguliuojančią medžiagą. Sudėtis pateikta 1 priede. EK gamyba: augaliniai ekstraktai, dažai ištirpinami dalyje išgryninto vandens ir nufiltruojami. Filtratas buvo maišomas su sorbitolio ir glicerolio mišiniu iki kol tirpalas visiškai nuskaidrėjo. Intensyviai maišant buvo suberiami ksantano lipai, vėliau pridėjus likusią išgryninto vandens dalį laboratorinio homogenizatoriaus (IKA T25 Ultra Turrax, Vokietija) pagalba tirpalas buvo homogenizuojamas iki tolygios konsistencijos. Pridėjus pieno rūgštį (aktyviąją medžiagą) tirpalas dar kartą laboratorinės maišyklės (IKA Eurostar 20 digital, Vokietija) pagalba buvo maišomas iki vienalytės masės. Pagamintos EK buvo perkeliamos į sandarų indą ir paliekamos 24 valandoms (20–22 °C). Po 24 valandų buvo atliekami fizikinių parametru nustatymai.

EK su **jodo povidonu** buvo sukurta naudojant odą minkštinančius produktus, ramunėlių (*Chamomilla recutita*) ekstraktą ir klampumą reguliuojančią medžiagą. Trys eksperimentinės kompozicijos paruoštos analogišku metodu, tačiau buvo naudojamos skirtingos tirštinimo koncentracijos (2 priedas). EK gaminimas: augalinis ekstraktas, sorbitolis ir glicerolis buvo ištirpinami dalyje išgryninto vandens ir nufiltruojami. Intensyviai maišant laboratorinio homogenizatoriaus (IKA T25 Ultra Turrax, Vokietija) pagalba lėtai buvo suberiami ksantano lipai, tirpalas homogenizuojamas iki tolygios konsistencijos. Pridėjus jodo povidono (aktyvioji medžiaga) tirpalas dar kartą laboratorinės maišyklės (IKA Eurostar 20 digital, Vokietija) pagalba buvo maišomas iki vienalytės masės. Sukurtos EK buvo perkeltos į sandarų indą ir paliktos 24 valandoms (20–22 °C). Po 24 valandų buvo atliekami fizikinių parametru nustatymai.

EK su **chlorheksidino digliukonatu** buvo sukurta parinkus odą minkštinančias medžiagas, tirštinimą (guaro lipus), mėtų eterinį aliejų, paprastojo kaštono ekstraktą (*Horse chesnut*), pH reguliuojančias medžiagas, dažus. Trys EK buvo sukurtos analogišku metodu, tačiau naudojant skirtingas tirštinimo ir dažų koncentracijas (3 priedas). EK gaminimas: guaro lipai laboratorinio

homogenizatoriaus (IKA T25 Ultra Turrax, Vokietija) pagalba buvo disperguojami dalyje vandens ir pagal būtinybę buvo reguliuojamas šio tirpalo pH citrinos rūgštimi. Mėtų eterinis aliejus ir glicerolis buvo ištirpinti izopropilo alkoholyje. Paprastojo kaštono ekstraktas ir dažai buvo ištirpinami dalyje išgryninto vandens ir nufiltruojami. Likusiame išgrynintame vandenyje buvo ištirpinamas polisorbato 80 ir pagal reikmę reguliuojamas šio tirpalo pH natrio hidroksidu. Į guaro lipų tirpalą palaipsniui buvo supilamas izopropilo alkoholio, glicerolio ir mėtų eterinio aliejaus mišinys. Po to buvo pridedamas augalinio ekstrakto ir dažų mišinys ir gerai išmaišius – išgryninto vandens ir polisorbato 80 tirpalas. Paskutiniame etape buvo pridedamas chlorheksidino digliukonato 20 proc. tirpalas (aktyvioji medžiaga) ir tirpalas dar kartą laboratorinės maišyklės (IKA Eurostar 20 digital, Vokietija) pagalba buvo maišomas iki vienalytės masės. Pagamintos EK buvo perkeliamos į sandarų indą ir paliekamos 24 valandoms (20–22 °C). Po 24 valandų buvo atliekami fizikinių parametrų nustatymai.

2.3. EK reologinių savybių vertinimo metodika *in vivo*

Spenių vilgiklių kūrimo metu buvo iškeltas uždavinys – pasirinktoms skirtingoms antiseptinėms medžiagoms parinkti tirštiklio bei dažų koncentraciją, sukurti produktą, kuris tinkamai padengtų spenio odą, laikytųsi reikiamą laiką ir po vilgymo tinkamai nudažytų spenių odą. Kuriant EK svarbiausia buvo tirštiklio koncentracijos parinkimas, kad naujai kuriamas vilgiklis atitiktų reikalavimus, t. y. būtų pageidaujamos konsistencijos, nelašėtų, susidarytų lašas spenio gale.

In vivo tyrimas buvo atliktas siekiant įvertinti sukurtų ir laboratoriniu būdu pagamintų eksperimentinių kompozicijų atitiktį numatytiems reikalavimams. Pieno ūkyje, kuriame buvo atliktas tyrimas, laikoma 450 Lietuvos žalių veislės karvių, kurių vidutinis produktyvumas – 10 500 kg per laktaciją. Karvės melžiamos melžimo aikštelėje du kartus per dieną. *In vivo* tyrimas buvo atliktas su 75 karvėmis; t. y., trims EK su ta pačia antimikrobine medžiaga įvertinti buvo sudarytos trys bandomosios grupės po 25 karves. Vėliau tyrimas pakartotas siekiant įvertinti kitas EK, su kitomis dviem antimikrobinėmis medžiagomis. Po melžimo karvių speniai buvo nedelsiant panardinami į EK tirpalus iki 3/4 spenių ilgio. Šio tyrimo metu buvo įvertinti vizualiniai rodikliai pagal originalią metodiką [55]. Pasirinkti rodikliai ir vertinimo kriterijai nurodyti 2.3.1 lentelėje.

2.3.1 lentelė. Eksperimentinių spenių vilgiklių kompozicijų vertinimo kriterijai balais in vivo

Rodiklis	Vertinimo kriterijus
Spalva	
1 balas	Po vilgymo spalva sunkiai matoma. Po 60 minučių spalvos nesimato.
2 balai	Po vilgymo spalva yra ryški ir gerai išsilaiko 10 min. Po 60 minučių spalva sunkiai pastebima.
3 balai	Po vilgymo spalva yra ryški ir gerai išsilaiko 10 min. Po 60 minučių spalva nepasikeitė. Po 12 valandų spalvos likučių nesimato.
4 balai	Po vilgymo spalva yra ryški ir gerai išsilaiko 10 min. Po 60 minučių spalva nepasikeitė. Po 12 valandų spalvos likučiai matomi tik ant dalies spenių.
5 balai	Po vilgymo spalva yra ryški ir gerai išsilaiko 10 min. Po 60 minučių spalva nepasikeitė. Po 12 valandų matosi spalvos likučiai.
Nulašėjimas iškart po vilgymo	
1 balas	Po vilgymo nulašėjimas intensyvus (daugiau nei 6 lašai per pirmą minutę).
2 balai	Po vilgymo nulašėjimas intensyvus (per pirmąją minutę 4–6 lašai).
3 balai	Po vilgymo nulašėjimas vidutinio intensyvumo (2–4 lašai per pirmąją minutę).
4 balai	Po vilgymo nulašėjimas neintensyvus (ne daugiau kaip 2 lašai per pirmą minutę).
5 balai	Po vilgymo nulašėjimas neintensyvus (ne daugiau kaip vienas lašas per pirmą minutę).
Lašo susidarymas ant spenio galo	
1 balas	Lašas nesusidaro; nulašėjimas per intensyvus.
2 balai	Po 5 minučių susidaro pailgas lašas, kuris nenukrenta. Po 30 minučių kabančio lašo nebesimato.
3 balai	Po 5 minučių susidaro pailgas lašas, kuris nenukrenta. Po 60 minučių kabančio lašo nebesimato.
4 balai	Po kelių (2–3) minučių susidaro stabilus kabantis lašas, kuris kabo ne trumpiau kaip 40 min. Po 60 minučių kabančio lašo nebesimato.
5 balai	Po kelių (2–3) minučių susidaro stabilus kabantis lašas. Po 60 min matomas kabantis lašas.
Spenio padengimas plėvele	
1 balas	Padengia labai stora plėvele, didelė produkto išeiga.
2 balai	Padengia stora plėvele, didelė produkto išeiga.
3 balai	Padengia plona plėvele, kuri dėl stipraus lašėjimo tampa dar plonesnė ir nestabili.
4 balai	Padengia spenio odą plėvele su nežymiais netolygumais, beveik lygiu sluoksniu.
5 balai	Padengia spenio odą tolygia plėvele, lygiu sluoksniu.

2.3.1 lentelės tęsinys

Rodiklis	Vertinimo kriterijus
Spenio padengimo tolygumas	
1 balas	Padengia netolygiai.
2 balai	Padengia patenkinamai tolygiai.
3 balai	Padengia vidutiniškai tolygiai.
4 balai	Padengia pakankamai tolygiai.
5 balai	Padengia tolygiai.
Bendras eksperimentinių spenių vilgiklių formulių įvertinimas	
Iš viso balų	

Protokoluose buvo fiksuojamos tyrimo rodiklių reikšmės vizualiai taikant 5 balų sistemą. Tolimesniam tyrimui buvo atrinktos trys EK su skirtingomis antibakterinėmis medžiagomis (daugiausia balų surinkusios kompozicijos).

2.4. Stabilumo programos metodika

EK stabilumo tyrimų procesas buvo vykdytas remiantis Colipa „Kosmetikos gaminių stabilumo bandymų gairės“ [203].

Vykdytos 2 stabilumo programos: **realaus laiko** ir **pagreitinto stabilumo**, kurių metu buvo tirti ir vertinti EK fizikinių savybių bei mikrobiologinio pokyčio parametrai.

Tyrimams reikalingas ėminių skaičius buvo atidedamas pagal iš anksto parengtą numatomą tyrimų planą. Ėminiai buvo atrenkami ir paimami vadovaujantis ir remiantis LST EN ISO 9001 (Kokybės vadybos sistemos) ir LST EN ISO 227716 (Kosmetikos gaminių Geros gamybos praktika) standartais [204, 205].

Realaus laiko stabilumo tyrimų metu produktas buvo laikomas 25 ± 2 °C temperatūroje esant 60 ± 5 proc. santykiniam oro drėgniui bei buvo stebimi produkto savybių pokyčiai po 24 val. 6, 12, 24 mėn. po pagaminimo.

Tiriant produktą **pagreintu būdu**, mėginiai buvo laikyti klimatinėse spintose Binder KBF (Binder GmbH, Vokietija), t. y. sandariose talpyklose, taikyti tyrimų intervalai: po 24 valandų pagaminus produktą; po 2 mėn. laikymo $+45$ °C temperatūroje (santykinis oro drėgnis – 75 ± 5 proc.); po šaldymo/šildymo ciklo (10 dienų laikoma esant $+4$ °C; 10 dienų laikoma esant $+45$ °C; 10 dienų laikoma esant $+4$ °C; 10 dienų laikoma esant $+45$ °C; 10 dienų laikoma esant $+15$ °C (santykinis oro drėgnis – 75 ± 5 proc.).

Testai stabilumo programų metu buvo sudaryti taip, kad būtų galima patikimai įvertinti šiuos aspektus: fizikinių savybių ir mikrobiologinį stabilumą ir nustatyti EK galiojimo laiką.

2.5. Fizikinių savybių bei mikrobiologinio pokyčio įvertinimas stabilumo tyrimų metu

2.5.1. Klamos matavimo metodika

Kiekvienos EK klamos reikšmė buvo nustatoma praėjus 24 valandoms nuo pagaminimo ir stabilumo tyrimo metu po 6, 12, 24 mėn. Vilgiklių EK dinaminė klampa buvo matuojama esant 20 °C temperatūrai rotaciniu viskozimetru NDJ-1 (COMECTA S.A., Italija). Matavimai buvo atlikti naudojant standartinį tyrimo metodą (STM), kuris parengtas pagal prietaiso instrukciją ir Europos farmakopėją [177]. Tyrimo principas: sinchroninis variklis sukasi vienodu greičiu, prijungia skalės plokštę ir priverčia rotatorių sukstis per spyruoklę ir besisukantį veleną. Rotatoriaus veikimas priklauso nuo sukimo momento, proporcingo skysčio klampumui ryšium su skysčio klamos histerize. Davikliai fiksuoja sukimo momentą, kuris konvertuojamas į klampumo rodiklį ir vizualizuojamas ekrane. Absoliutus klampumas buvo apskaičiuotas pagal formulę: $\eta = k \times \alpha$, čia η – absoliuti klampa; k – koeficientas (parenkamas pagal prietaiso instrukcijos lentelę); ir α – rodiklio reikšmę rodantis skaičius. Buvo atliekami kiekvieno mėginio 3 matavimai ir apskaičiuojamas vidurkis. Rezultatai pateikiami nurodant absoliutinę klampą.

2.5.2. pH matavimo metodika

Matavimai buvo atlikti naudojant laboratorinį pH-metrą InoLab pH 7310 (Xylem Analytics Germany GmbH, Oberbayern, Vokietija). Matavimo metodika buvo parengta pagal prietaiso instrukciją ir Europos farmakopėją [177]. Principas: potenciometrinis metodas. Prieš atliekant tyrimus pH-metras buvo kalibruojamas standartiniais buferiniais tirpalais pagal prietaiso instrukciją. Matavimai buvo atliekami tiriamąjį mėginį patalpinus į laboratorinę stiklinę ir pH-metro elektrodą įmerkiant į tiriamąjį ėminį, esantį stiklinėje. Buvo fiksuojama ir užrašoma parametro vertė. Kokybės užtikrinimui buvo atliekami 3 paraleliniai matavimai. Rezultatai pateikiami išvedus tyrimo metu gautų duomenų aritmetinį vidurkį.

2.5.3. Centrifugavimo testo metodika

EK centrifugavimo bandymas buvo atliktas praėjus 24 val. po pagaminimo, po šaldymo /šildymo ciklo ir po 2 mėnesių, laikant +45 °C temperatūroje. Centrifugavimo testas buvo atliktas EBA 20 laboratorine centrifuga

(Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Vokietija). Į CLEARLine® centrifuginius mėgintuvėlius buvo įpilta po 8 ml eksperimentinio, naujai sukurto spenių vilgiklio tirpalo ir centrifuguojama 8 minutes 4500 aps./min. Tirpalo formulės stabilumui įvertinti buvo stebimas fazių atsiskyrimo ir drumstumo atsiradimas.

2.5.4. Produkto išvaizdos stebėseną

Kvapas, spalva ir homogeniškumas buvo įvertinti naudojant STM parngtus pagal Europos farmakopėją [177]. Homogeniškumui įvertinti buvo naudotas vizualinis metodas. Ant dviejų objektinių stiklelių buvo paruošiami keturi tiriamojo produkto apie 0,02 g mėginiai. Buvo uždengiama antru tokiu pat stikleliu ir stipriai prispaudžiama, ko pasėkoje susidaro maždaug 2 cm diametro dėmės. Žiūrint pro šviesą maždaug 30 cm atstumu neturi būti pastebima atskirų dalelių trijuose iš keturių mėginių. Jei dalelės buvo pastebimos didesniame dėmių skaičiuje, bandymas pakartojamas papildomai su 8 mėginiais. Matomos dalelės šiuo atveju gali būti pastebimos ne daugiau kaip 2 mėginiuose. Jei dalelės pastebimos didesniame mėginių skaičiuje, produktas nėra homogeniškas.

Spalvos nustatymas buvo atliekamas vizualiniu metodu. Tyrimo eiga: plonas gaminio sluoksnis apžiūrimas baltame fone. Esant teigiamiems tyrimo rezultatams tyrimo išvada turi sutapti su produkto specifikacijoje nurodyta spalva. Tiek spalvos, tiek homogeniškumo tyrimas buvo atliekamas šviesos spintoje (Byko-Spectra basic, JAV).

Kvapo įvertinimo tyrimas buvo atliekamas taip: nedidelis mėginio kiekis (0,5–2,0 g) įpilamas į cheminę stiklinę ir po 15 min. nustatinėjamas kvapas. Vertinimas pateikiamas nurodant tam produktui būdingą kvapą. Pvz., specifinis jodo kvapas.

Rezultatai buvo pateikiami nurodant gautą vertinimo rezultatą.

2.5.5. Jodo kiekio nustatymo metodika

Cheminis tyrimas buvo atliekamas jodometrijos metodu. Į 5–10 g mėginio, buvo įpilama 2 ml vandens, 1 ml praskiestos acto rūgšties (12 g ledinės acto rūgšties praskiestos analizės vandeniu iki 100 ml), išmaišoma, pridedama 50 ml vandens. Išmaišoma ir titruojama 0,1N natrio tiosulfatu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), kaip indikatorių naudojant krakmolo tirpalą (5 g tirpaus krakmolo ištirpinama 30 ml vandens ir supilama į 1000 ml verdančio vandens). Buvo titruojama tol, kol išnyksta spalva.

Jodo kiekio skaičiavimas: jodo kiekis proc. buvo apskaičiuojamas pagal formulę:

$$Q = 12,69 \times \frac{c \times V}{m}$$

kur: m – mėginio masė, g;

V – nutrituoto natrio tiosulfato tūris, ml;

c – natrio tiosulfato koncentracija mol/l.

2.5.6. Bakterinės taršos tyrimo metodika

Metodika buvo parengta pagal galiojančius Europos farmakopėjos straipsnius: 20612 Nesterilių produktų mikrobiologinis tyrimas: mikroorganizmų kiekio nustatymo testai; 20613 Nesterilių produktų mikrobiologinis tyrimas: specifinių mikroorganizmų nustatymo testai [177].

Į plastikinį sterilų maišelį buvo pasveriami 10 g produkto. Skysti produktai buvo matuojami pipete. Buvo įpilama 90 ml skiediklio (fosfatinis buferinis tirpalas su peptonu ir 0,1 proc. polisorbato 80). Kad mikroorganizmai nepatirtų streso, skiediklis buvo aplinkos temperatūros. Mišinys buvo homogenizuojamas 60 s ir gaunama pradinė suspensija (10^{-1}).

1 ml paruoštos pradinės suspensijos (10^{-1}) buvo įpilama į sterilią Petri lėkštelę. Į kitą sterilią Petri lėkštelę kita pipete buvo įpilama po 1 ml pirmo dešimtkarčio skiedinio (10^{-2}).

Į lėkšteles buvo įpilama apie 15–20 ml triptozės sojos agarų (TSA, Oxoid Ltd, Jungtinė Karalystė), atvėsinto vandens vonelėje iki 44–47 °C. Buvo sumaišoma, leidžiama sustingti. Lėkštelės buvo apverčiamos ir inkubuojamos 5 paras termostate 30 °C temperatūroje.

Aerobiniai mikroorganizmai skaičiuojami tose lėkštelėse, kuriose užaugo mažiau nei 250 kolonijų.

Bendras aerobinių mikroorganizmų skaičius 1 g/ml mėginio buvo apskaičiuojamas pagal formulę:

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

kur: $\sum C$ – dviejų, serijinių skiedimų kolonijų suma, suskaičiuotų Petri lėkštelėse (t. y., kuriose užaugo ne daugiau kaip 250 kolonijų vienetų);

V – užsėtos medžiagos tūris lėkštelėje mililitrais;

n_1 – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

n_2 – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

d – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas (pvz., 10^{-1} , 10^{-2}).

Jeigu dviejose lėkštelėse su tiriamuoju mėginiu nėra kolonijų, rezultatas pateikiamas taip: $< 1,0 \times 10^1$, t. y. mažiau nei 10.

Bendro aerobinių mikroorganizmų skaičiaus rezultatas pateikiamas išreikštas skaičiumi tarp 1,0 ir 9,9, padauginantu iš atitinkamu laipsniu pakelto 10, arba sveikuoju skaičiumi iš dviejų reikšminių skaitmenų.

2.6. Mėginių tekstūros analizės tyrimo metodika

Buvo atlikti atgalinio išstūmimo (angl. *Back extrusion*) ir paskirstymo (angl. *Spreadability*) testai [189]. **Atgalinio išstūmimo** testo metu buvo analizuotas mėginių kietumas, konsistencija, kohezija bei klampos indeksas, o **paskirstymo** testo metu – tvirtumas ir šlyties darbas. Vertinant šių charakteristikų rodiklius buvo galima objektyviai įvertinti preparato juslines charakteristikas ir preparato sudėties įtaką produkto tekstūros savybėms.

Tyrime buvo naudota aparatūra – tekstūros analizatorius *Stable Micro Systems Texture Analyser TA.XT plus* (Jungtinė Karalystė). Prie analizatoriaus platformos suklio buvo prisukta A/BE disko formos plokštelė (skersmuo 45 mm). Į 50 mm skersmens 100 ml talpos indelį dedamas tiriamasis preparatas (užpildoma maždaug 3/4 indo tūrio). Rezultatai buvo vertinami kompiuterine programa Exponent (programos versija 6.1.5.0, Jungtinė Karalystė). Prieš pradėdant testą suklys su plokštele buvo nuleidžiamas prie mėginio paviršiaus ir pradėdamas matavimas (tyrimo parametrai: atstumas – 15 mm/s, greitis – 3 mm/s). Exponent programos lange buvo brėžiamas grafikas, kuriame matomi gauti tiriamieji rodmenys. Bandymas buvo kartojamas tris kartus ir vedamas gautų rezultatų vidurkis.

2.7. Antimikrobinių medžiagų skvarbos į odą *ex vivo* tyrimo metodika

Skvarbos į odą tyrimui buvo panaudoti karvės spenių odos mėginiai, paruošti VA Veterinarinės patobiologijos katedros Patologijos centre iš karvės tešmens, kuris buvo gautas iš UAB Krekenavos agrofirma skerdyklos paskerdus kliniškai sveiką 4 metų karvę. Spenių oda buvo atpreparuota histomorfologinio tyrimo metu. Paruošti prieš tyrimą mėginiai buvo laikomi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ne ilgiau kaip 6 mėnesius. *Ex vivo* skvarbos į odą tyrimui buvo naudotos Bronaugh tipo pratakios difuzinės celės. Difuzinės celės su karvės spenio odos mėginiais ($1,77\text{ cm}^2$) buvo patalpinamos ant specialaus $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ palaikančio šildymo bloko. Efektyvus difuzijos plotas celėje buvo $0,64\text{ cm}^2$. EK galutinio produkto tirpalas ($0,51 \pm 0,01\text{ g}$), kaip donorinė fazė, buvo užneštas ant karvės spenio odos 8 val. laikotarpiui. Siekiant apsaugoti tiriamąjį produktą nuo išorės poveikio difuzinės celės buvo uždengtos aliuminio folija. Po 8 val. donorinė fazė buvo pašalinta nuo karvės spenio odos

paviršiaus ir keletą kartų perplaunama išgrynintu vandeniu. Nuo odos mėginių ($0,64 \text{ cm}^2$) pašalinus išorinius likučius pastarieji buvo 30 minučių ekstrahuoti 1 ml grynu metanoliu, naudojant Bandelin Sonorex Digitec ultragarso vonelę (DT 156, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlynas, Vokietija). Vėliau mėginiai (PR-2 tyrimas) buvo analizuojami dujų chromatografijos ir ultra-efektyviosios skysčių chromatografijos (CHD-2 tyrimas) (UESC) metodu [206]. Analizės duomenų kaupimui ir apdorojimui buvo naudota SurfaceLab 6 programinė įranga (ION-TOF GmbH, Miunsteris, Vokietija).

2.8. EK antimikrobinio poveikio *in vitro* su referentinėms mikroorganizmų kultūromis tyrimo metodika

Pagamintų optimalių EK su skirtingomis antimikrobinėmis medžiagomis baktericidinis, fungicidinis aktyvumas pagal standartus EN 1656 ir EN 1657 buvo įvertintas skiedimo neutralizacijos metodu [207, 208]. Standartuose aprašytais bandymo metodais buvo siekiama įvertinti, ar veiksmingi tiriamieji skirtingos sudėties vilgikliai, siekiant sumažinti bandyme naudojamų gyvybingų mikroorganizmų skaičių. Atliekant šį tyrimą buvo analizuojamas vilgiklių aktyvumas prieš referentinius mikroorganizmus: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Streptococcus uberis* ATCC 19436, *Candida albicans* ATCC 10231 ir *Aspergillus niger* (*A. niger*) ATCC 16404. Aktyvumas apibūdinamas referentinio mikroorganizmo gyvybingumo sumažėjimu 10^5 arba daugiau, esant šioms pasirinktoms bandymo sąlygoms (temperatūra $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, ekspozicijos laikas 5 min., produkto 80 proc., 50 proc. ir 10 proc. tiriamosios koncentracijos, pridėdant trukdančiąją medžiagą t. y. lieso pieno 10 g/l). Naudotos mitybinės terpės: triptozės sojos agaras (TSA) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Vokietija), salyklo ekstrakto agaras (MEA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Vokietija). Vilgiklio aktyvumo rodiklis prieš tyrime naudotus mikroorganizmus buvo išreiškiamas logaritmu. Logaritmas buvo skaičiuojamas pagal formulę $\text{Log R} = \text{LogN}_o - \text{LogN}_a$ (R – gyvybingumo sumažėjimas; N_o – yra KSV/ml skaičius tiriamajame tirpale; N_a – yra KSV/ml skaičius po produkto antimikrobinio aktyvumo tyrimo procedūros). Remiantis standartais EN 1656 ir EN 1657, vilgiklis laikomas baktericidiškai aktyviu, jei tyrimo metu gauta logaritmo reikšmė viršija 5, t. y. $\text{log R} > 5$, o fungicidiškai aktyviu, jei gauta logaritmo reikšmė viršija 4, t. y. $\text{log R} > 4$.

2.9. EK antimikrobinio poveikio *in vitro* su klinikinėmis mikroorganizmų kultūromis tyrimo metodika

Tyrimas buvo atliekamas taikant metodą, pagrįstą tiriamosios medžiagos sugebėjimu difunduoti mitybinėje terpėje (difuzijos į agarą metodas) [209]. Eksperimentinių kompozicijų antimikrobinis aktyvumas buvo nustatomas standžioje terpėje šulinėlių metodu aseptinėmis sąlygomis. Bakterijų atsparumas mėginiams buvo vertinamas Mueller-Hinton agare (BBL, Cockeysville, JAV) ir Saburo agare (BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, JAV) aseptinėmis sąlygomis naudojant iš klinikinės medžiagos išskirtus mikroorganizmus. Mikroorganizmų suspensija buvo gaminama iš išaugintų kultūrų fiziologiniame natrio chlorido (0,9 proc.) tirpale, standartizuojama McFarland'o standartiniu indikatoriumi („Standart indikator McFarland“ Biosan, Latvija), kuris matuoja mėgintuvėlyje esančios suspensijos drumstumą. Mikroorganizmų suspensija buvo laikoma standartizuota, kai indikatoriaus reikšmė lygi 0,5 (tai reiškia, kad 1 ml bakterijų suspensijos yra $1,5 \times 10^8$ bakterinių dalelių). Etaloninės mieliagyrio *C. albicans* ir dumblio *P. zopfii* kultūros buvo auginamos 24 val. 30 °C temperatūroje ant Saburo agaro (Liofilchem, Italija). Mikroorganizmų suspensija buvo gaminama iš užaugintų kultūrų fiziologiniame tirpale, standartizuojama McFarland'o standartiniu indikatoriumi. Mikroorganizmų suspensija (20 ml) agaro gelyje buvo įpilama į sterilias 90 mm diametro Petri lėkštelės (F. L. Medical, Italija). Sustingusiame gelyje buvo padaromi 7 mm vidinio diametro šulinėliai, jie pripildomi testuojamo vilgiklio (0,1 ml). Petri lėkštelės buvo inkubuojamos 30 °C termostate. Po 24 valandų inkubavimo buvo matuojamas skaidrios zonos skersmuo, susidaręs aplink šulinėlius esant antimikrobiniam aktyvumui. Grybelių ir dumblių atsparumas vilgiklių EK buvo vertinamas po 48 valandų inkubacijos. Tose agaro dalyse, kuriose koncentracija yra pakankama, kad slopintų mikroorganizmų augimą, buvo matoma skaidri zona, kurios dydis nusako antimikrobinį aktyvumą (tiesinė priklausomybė). Duomenų įvertinimui buvo apskaičiuotas eksperimentinių tyrimų duomenų matematinis vidurkis bei standartinis nuokrypis.

2.10. Statistinė duomenų analizė

Gauti tyrimų rezultatai buvo statistiškai apdoroti naudojant statistinius duomenų analizės paketus: Microsoft Office Excel 2021, IBM SPSS Statistics 29.0.0.0.

Dėl rezultatų patikimumo bandymas buvo kartojamas mažiausiai 3 kartus ir išvedamas aritmetinis vidurkis bei skaičiuojamas standartinis nuokrypis. Skirtumai buvo laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

Eksperimentinių spenių vilgiklių kompozicijos buvo vertintos balais. Buvo sudaryti vertinimo balų skirstiniai, skirtumai tarp vilgiklių įvertinti Chi-kvadrato testu. Taip pat buvo apskaičiuoti vertinimo balų vidurkiai, variacija įvertinta pateikiant vidurkių paklaidas. Skirtumai tarp vilgiklių buvo įvertinti dispersinės analizės metodu su Tukey B *post hoc* kriterijumi. Koreliacijos koeficientas buvo apskaičiuotas pagal Pearson. Skirtumai buvo laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

Buvo apskaičiuoti pH, klampos ir jodo koncentracijų vidurkiai lyginamose imtyse, variacija įvertinta pateikiant vidurkio paklaidą. Skirtumai tarp vilgiklių įvertinant pokyčius laike buvo įvertinti tiesiniais modeliais su laiko ir vilgiklio faktoriais. Skirtumai tarp vilgiklių fiksuotu laiku bei pokyčiai dėl vilgiklio poveikio bėgant laikui buvo įvertinti Tukey B *post hoc* kriterijumi.

Tekstūros analizės metu buvo apskaičiuoti tekstūros vidurkiai lyginamose imtyse, variacija įvertinta pateikiant vidurkio paklaidą. Skirtumai tarp vilgiklių buvo įvertinti dispersinės analizės metodu su Tukey B *post hoc* kriterijumi. Skirtumai buvo laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

Antimikrobinio poveikio *in vitro* ir skvarbos į odą *ex vivo* tyrimo metu buvo skaičiuoti imčių vidurkiai, santykiniai standartiniai nuokrypiai, standartinės paklaidos. Skirtumai buvo laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. Spenių vilgiklių tiriamųjų kompozicijų kūrimas ir gamyba

Buvo pagamintos devynios EK, po tris su kiekviena antimikrobine medžiaga. EK buvo vienalytiškos homogeninės išvaizdos, turėjo atitinkamai spalvą ir būdingą konsistenciją bei specifinį sudedamųjų medžiagų kvapą.

Panaudojus antimikrobinę medžiagą – pieno rūgštį, sukurtos ir tolimesniems *in vivo* tyrimams buvo pagamintos trys EK su skirtingomis ksantano lipų ir dažiklio CI 15985 koncentracijomis atitinkamai: EK su pieno rūgštimi Nr. 1 (PR-1) – 0,5 proc. ir 0,01 proc.; EK su pieno rūgštimi Nr. 2 (PR-2) – 0,67 proc. ir 0,03 proc.; EK su pieno rūgštimi Nr. 3 (PR-3) – 0,85 proc. ir 0,05 proc. Panaudojus nurodytas ksantano lipų koncentracijas gaunama EK PR-1 – klampa 650–700 mPa·s, EK PR-2 – 900–950 mPa·s, EK PR-3 – 1050–1100 mPa·s. Pagamintų EK pH vertės svyravo 2,6–2,8 ribose. EK buvo vienalytiškos homogeninės išvaizdos, turėjo oranžinę spalvą, specifinį pieno rūgšties kvapą ir būdingą konsistenciją.

Panaudojus antimikrobinę medžiagą – jodo povidoną, buvo sukurtos ir tolimesniems *in vivo* tyrimams pagamintos trys EK su skirtingomis ksantano lipų koncentracijomis, bet nenaudojant pridėtinio dažiklio. Ksantano lipų koncentracija EK su jodo povidonu Nr. 1 (JP-1) – 0,5 proc., EK su jodo povidonu Nr. 2 (JP-2) – 0,67 proc. ir EK su jodo povidonu Nr. 3 (JP-3) – 0,85 proc. atitinkamai. Naudojant nurodytas ksantano lipų koncentracijas gaunama EK JP-1 klampa – 650–700 mPa·s, EK JP-2 – 850–900 mPa·s, EK JP-3 – 1050–1100 mPa·s. Pagamintų kompozicijų pH vertės svyravo 2,1–2,3 ribose. EK buvo vienalytiškos homogeninės išvaizdos, rudai oranžinės spalvos, specifinio jodo kvapo ir būdingos konsistencijos.

Panaudojus antimikrobinę medžiagą – chlorheksidino digliukonatą, buvo sukurtos ir tolimesniems *in vivo* tyrimams pagamintos trys EK su skirtingomis guaro lipų ir dažiklio CI 16255 koncentracijomis atitinkamai: EK su chlorheksidinu Nr. 1 (CHD-1) – 0,5 proc. ir 0,02 proc.; EK su chlorheksidinu Nr. 2 (CHD-2) – 0,89 proc. ir 0,05 proc.; EK su chlorheksidinu Nr. 3 (CHD-3) – 1,2 proc. ir 0,12 proc. Atlikus matavimus nustatyta, jog EK CHD-1 klampa – 1250–1300 mPa·s, EK CHD-2 – 1450–1500 mPa·s, EK CHD-3 – 1700–1750 mPa·s. Pagamintų kompozicijų pH vertės svyravo ribose 5,8–6,1. EK buvo vienalytiškos homogeninės išvaizdos, turėjo raudoną spalvą, mėtų kvapą ir būdingą konsistenciją.

Šiame etape buvo įgyvendintas uždavinys sukurti EK derinant antimikrobines medžiagas (pieno rūgštį, chlorheksidino digliukonatą, jodo povidoną) su natūraliais tirštikliais, dažikliais ir augaliniais ekstraktais.

3.2. Eksperimentinių kompozicijų reologinių savybių vertinimo *in vivo* ir atrankos rezultatai

Tyrimo metu buvo įvertintas tirtų eksperimentinių kompozicijų spenio padengimas plėvele ir padengimo tolygumas, barjerinio lašo susidarymas ant spenio galo, matomumas (vertinama spalva) ir ekonomiškumas (vertintas nulašėjimas po vilgymo).

EK su pieno rūgštimi vertinimo *in vivo* metu (3.2.1 pav.) buvo nustatyta (3.2.1 lentelė, 4 priedas), kad PR-1 kompozicijoje ksantano lipų koncentracija (0,5 proc.) yra netinkama. Nors dengė spenio odą tolygia plėvele ir formavo po 5 minučių pailgą stabilų lašą, po 60 minučių kabančio lašo nebesimatė. Viena priežasčių – iš karto po vilgymo eksperimentinis produktas pernelyg intensyviai nulašėjo.

PR-3 kompozicija su pieno rūgštimi ir 0,85 proc. ksantano lipų produkte kiekiu spenius dengė plona, nestabilia ir tik vidutiniškai tolygia plėvele. Be to, ir pačiam produktui trūko vizualiai kokybiškam gaminiui tinkamos išvaizdos (homogeniškumo). Po vilgymo buvo fiksuotas vidutinis nulašėjimo intensyvumas, nors po kelių (2–3) minučių susidarydavo stabilus kabantis lašas, kuris kabo ne trumpiau kaip 60 min.

Šios dvi kompozicijos neatitiko produktui keliamų reikalavimų. PR-2 kompozicijai su 0,67 proc. ksantano gumos kiekiu buvo nustatytas neintensyvus lašėjimas po vilgymo (ne daugiau kaip 2 lašai per pirmą minutę). Ši EK bandymo metu padengė tolygia plėvele pavilgytą spenio plotą, po keleto minučių susidarė stabilus lašas spenio gale, kuris išsilaiko mažiau kaip 60 minučių. PR-2 kompozicija surinko didesnę balų (3.2.1 lentelė) kiekį nei PR-1 ir PR-3.



3.2.1 pav. Sukurtų EK su pieno rūgštimi bandymo *in vivo* vizualizacija (matomas spenio padengimas vilgikliu suformuota barjerine plėvele) (aut. nuotraukos)



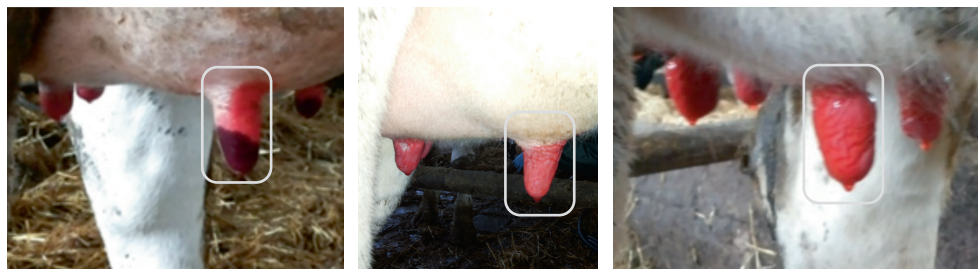
3.2.2 pav. Sukurtų EK su jodo povidonu bandymo *in vivo* vizualizacija (matomas spenio padengimas vilgiklio suformuota barjerine plėvele) (aut. nuotraukos)

EK su jodo povidonu vertinimo *in vivo* metu (3.2.2 pav.) buvo nustatyta (3.2.1 lentelė, 4 priedas), kad JP-1 kompozicijoje ksantano lipų koncentracija (0,5 proc.) taipogi yra per žema, produkto savybės neatitinka reikalavimų. Tyrimo eigoje buvo nustatyta, kad ši kompozicija spenį padengia pakankamai tolygia, tačiau plona ir nestabili plėvele, pasižymi intensyviu nulašėjimu iš karto po vilgymo, po 5 minučių susiformuoja pailgas lašas, kuris nenukrenta, tačiau po 60 min. kabančio lašo jau nebesimato. Po vilgymo spalva yra ryški ir gerai išsilaiko 10 min., tačiau jau po 60 minučių sunkiai pastebima.

JP-3 kompozicija su 0,85 proc. ksantano lipų kiekiu produkte spenius dengė plona ir tik patenkinamai tolygia plėvele, kuri, be to, ir nestabili. Po vilgymo buvo fiksuotas vidutinis nulašėjimo intensyvumas, nors po kelių (2–3) minučių susidarydavo stabilus kabantis lašas, kuris kabo ne trumpiau kaip 40 min. Po vilgymo spalva ryški, tačiau nevientisa dėl netolygaus vilgiklio padengimo. Po valandos spalvos intensyvumas nesumažėja.

Vertinant JP-2 eksperimentinę kompoziciją buvo nustatyta, kad po vilgymo spalva matosi ryškiai ir išsilaiko geriausiai iš visų bandytų kompozicijų su jodo povidonu, nes pats spenio padengimas pakankamai tolygus, lygiu sluoksniu. Po kelių minučių po vilgymo susidaro stabilus kabantis lašas spenio gale, kuris nenukrenta, išsilaiko ne trumpiau kaip 60 minučių.

Tyrimo metu (3.2.3 pav.) buvo nustatyta (3.2.1 lentelė, 4 priedas), kad EK CHD-1 tirštiklio koncentracija (hidroksipropilo guaro lipai – 0,5 proc.) buvo nepakankama, nes iš karto po vilgymo eksperimentinis produktas intensyviai lašėjo, padengė spenio odą plona plėvele, kuri buvo nestabili dėl stipraus lašėjimo, o spenio gale nesusidarė lašas. CHD-3 eksperimentinė spenių vilgiklio kompozicija, kurioje buvo 1,2 proc. hidroksipropilo guaro lipų, nebuvo patenkinama, nes iš karto po vilgymo eksperimentinis produktas intensyviai ir gausiai lašėjo (4–6 lašai per minutę), spenio oda buvo padengta per stora plėvele, todėl buvo gauta didelė produkto išeiga, produktas neekonomiškas.



3.2.3 pav. Sukurtų EK su chlorheksidino digliukonatu bandymo *in vivo* vizualizacija (matomas spenio padengimas vilgiklio suformuota barjerine plėvele) (aut. nuotraukos)

3.2.1 lentelė. EK *in vivo* tyrimų rezultatai balais pagal EK *in vivo* vertinimo metodiką (n = 25)

Eksperimentinės kompozicijos ir vertinimo rezultatai (vidutinis balas ± paklaida)									
Savybė	PR-1	PR-2	PR-3	JP-1	JP-2	JP-3	CHD-1	CHD-2	CHD-3
Spalva	4,0±0,09 c	4,0±0,08 c	3,8±0,11 c	2,2±0,07 a	4,1±0,09 c	4,0±0,04 c	2,8±0,07 b	4,9±0,06 d	4,9±0,07 d
Nulašėjimas iš kart po vilgymo	2,0±0,12 b	3,8±0,11 d	2,8±0,07 c	2,2±0,07 b	4,1±0,07 d	2,8±0,08 c	1,1±0,06 a	3,0±0,06 c	1,9±0,07 b
Lašo susidarymas ant spenio galo	3,0±0,07 b	4,9±0,07 e	3,9±0,07 cd	2,9±0,11 b	4,9±0,06 e	3,8±0,13 c	1,2±0,09 a	4,1±0,07 d	2,8±0,07 b
Spenio padengimas plėvele	4,9±0,06 d	4,9±0,06 d	2,8±0,08 b	3,1±0,08 c	4,9±0,06 d	3,0±0,07 bc	3,2±0,07 c	4,9±0,07 d	2,1±0,08 a
Spenio padengimo tolygumas	4,8±0,09 d	4,9±0,06 d	3,2±0,07 b	3,8±0,08 c	3,8±0,07 c	2,0±0,04 a	3,8±0,07 c	3,9±0,07 c	4,1±0,12 c
Bendras eksperimentinių spenių vilgiklių kompozicijų įvertinimas									
Iš viso balų	18,7	22,4	16,5	14,2	21,8	15,6	12,1	20,8	15,8
Ksantano lipai (proc.)	0,5	0,67	0,85	0,5	0,67	0,85	–	–	–
Guaro lipai (proc.)	–	–	–	–	–	–	0,5	0,89	1,20
Dažiklis (proc.)	0,01	0,03	0,05	–	–	–	0,02	0,05	0,12

a, b, c, d, e – skirtingomis raidėmis pažymėti vidurkiai eilutėje skiriasi tarpusavyje statistiškai reikšmingai (p < 0,05, Tukey B kriterijus).

CHD-2 eksperimentinė kompozicija (hidroksipropilo guaro lipų koncentracija 0,89 proc.) padengė spenį lygia plėvele, po kelių minučių spenio gale susidarė stabilus kabantis lašas, kuris kabojo ne trumpiau 40 min. Antro-

sios eksperimentinės kompozicijos klampa siekė 1450–1500 mPa·s. Visose trijose eksperimentinėse kompozicijose buvo naudojami skirtingi dažų kiekiai (atitinkamai 0,02–0,05–0,12 proc.). Po vilgymo spalva buvo aiškiai matoma (raudona) bei išliko matoma net po 60 min., tačiau ir vėliau antroje bei trečiojoje eksperimentinėse kompozicijose spalvos intensyvumas praktiškai nepakito. Taigi, priklausomai nuo dažų koncentracijos po 12 val., spalvos likučiai buvo matomi tik panaudojus 0,05–0,12 proc. dažų koncentraciją. Įvertinus lentelėje pateiktus duomenis tolesniam tyrimui buvo parinkta optimali antroji eksperimentinė kompozicija su 0,89 proc. hidroksipropilo guaro lipų ir 0,05 proc. dažiklio.

Tyrimo metu nebuvo nustatyta, kad dažų koncentracija galėtų turėti tiesioginės įtakos spenio padengimui plėvele, tačiau buvo galima teigti, kad dažų koncentracija EK PR-2 ir CHD-2 turėjo įtakos padengimo matomumui, bet matomumui turėjo įtakos spenio padengimas plėvele ir plėvelės tolygumas, sąlygotas tirštiklio koncentracijos.

Tyrimų *in vivo* ūkiuose metu nustatyta, kad EK CHD-2 su chlorheksidinu ir guaro lipų 0,89 proc. koncentracija, JP-2 su jodo povidonu ir ksantano lipų 0,67 proc. koncentracija bei PR-2 su pieno rūgštimi ir ksantano lipų 0,67 proc. koncentracija labiausiai atitiko kuriamam produktui keliamus reikalavimus (3.2.4 pav.). Remiantis vertinimo rezultatais, pateiktais 3.2.1 lentelėje, daugiausia balų (22,4) surinko PR-2 kompozicija, kuri tolygiau dengė spenio odą, greičiau formavo lašą spenio gale.



3.2.4 pav. Tyrimais patvirtintos geriausiai atitinkančios keliamus reikalavimus vilgiklių EK (PR-2, CHD-2, JP-2) (aut. nuotrauka)

3.3. EK fizikinių savybių bei mikrobiologinio pokyčio rezultatai stabilumo tyrimų metu

3.3.1. Realaus laiko stabilumo programos rezultatai

Sukurtų optimalios sudėties EK su chlorheksidino digliukonatu, jodo povidonu ir pieno rūgštimi realaus laiko stabilumo programos rezultatai pateikti 3.3.1.1 lentelėje.

3.3.1.1 lentelė. EK savybių vertinimo rezultatai realaus laiko stabilumo programoje pagal Colipa „Kosmetikos gaminių stabilumo bandymų gairės“ [203]

Vertinimo laikas	Homogeniškas	Spalva	Kvapas	pH	Klampa, mPa·s	Bendras aerobinių mikroorganizmų skaičius, KSV/g (ml)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
PR-2							
Po 24 val.	Homogeniškas	Oranžinė	Pieno rūgštis	2,70±0,10 A	936,67±5,77 a	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta
Po 6 mėn.	Homogeniškas	Oranžinė	Pieno rūgštis	2,67±0,12 A	903,33±5,77 b	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta
Po 12 mėn.	Homogeniškas	Oranžinė	Pieno rūgštis	2,73±0,06 A	866,67±5,77 c	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta
Po 24 mėn.	Homogeniškas	Oranžinė	Pieno rūgštis	2,60±0,00 A	826,67±5,77 d	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta
JP-2							
Po 24 val.	Homogeniškas	Rudai oranžinė	Jodo	2,20±0,10 B	886,67±15,28 a	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta
Po 6 mėn.	Homogeniškas	Rudai oranžinė	Jodo	2,20±0,10 B	856,67±5,77 b	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta
Po 12 mėn.	Homogeniškas	Rudai oranžinė	Jodo	2,20±0,10 B	820,00±10,00 c	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta
Po 24 mėn.	Homogeniškas	Rudai oranžinė	Jodo	2,20±0,10 B	786,67±20,82 c	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta

3.3.1.1 lentelės tęsinys

Vertinimo laikas	Homogeniškumas	Spalva	Kvapas	pH	Klampa, mPa·s	Bendras aerobinių mikroorganizmų skaičius, KSV/g (ml)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
CHD-2							
Po 24 val.	Homogeniškas	Raudona	Mėtų eterinio aliejaus	5,93±0,15 a C	1478,3±17,6 a	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta
Po 6 mėn.	Homogeniškas	Raudona	Mėtų eterinio aliejaus	5,93±0,15 a C	1460,0±14,0 ab	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta
Po 12 mėn.	Homogeniškas	Raudona	Mėtų eterinio aliejaus	5,93±0,15 a C	1435,0±15,0 bc	< 1,0 × 10 ¹	Nerasta
Po 24 mėn.	Nehomogeniškas, stebimos tamsios nuosėdos	Raudona	Mėtų eterinio aliejaus	5,23±0,06 b C	1420,0±10,0 c	Netirta	Netirta

a, b, c, d – skirtingomis raidėmis pažymėti vidurkiai stulpelyje (kiekvienam vilgikliui atskirai) skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$, Tukey B kriterijus); A, B, C – skirtingomis raidėmis pažymėti vidurkiai stulpelyje (tuo pačiu tyrimo laiku lyginami vilgikliai) skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$, Tukey B kriterijus); pateiktos tiriamųjų savybių vidutinės vertės ir vidurkio paklaidos (vidurkis ± paklaida).

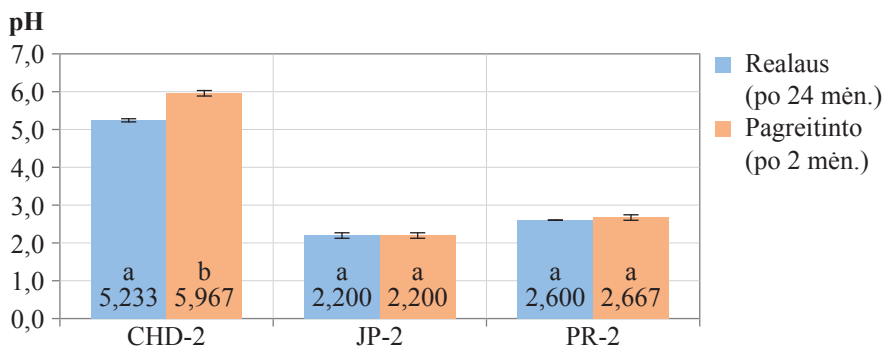
Vertinant EK PR-2 buvo nepastebėta juslinių savybių neatitikimo išskeltiems reikalavimams, stebėjimo laiką jos išliko homogeniškos, ryškios oranžinės spalvos, būdingo pieno rūgščiai kvapo ir nesusidrumstė, neišsluoksniavo praėjus 6, 12, 24 mėn. nuo pagaminimo. Vertinant realaus laiko stabilumo programoje, per 12 mėn. EK PR-2 pH vertė statistiškai reikšmingai nepasikeitė. Po 24 mėnesių vidutinė pH vertė sumažėjo iki 2,6 ($p > 0,05$). Atlikus koreliacinę analizę buvo nustatyti statistiškai reikšmingi tiesiniai ryšiai tarp pH visose šio vilgiklio EK serijose ($r = 0,97$).

Buvo nustatyta, kad EK PR-2 klamos rodiklis mažėjo statistiškai patikimai ($p < 0,05$), po 6 mėnesių – 3,4 proc. mažesnis nei pagaminus, po 12 mėnesių – 7,5 proc. ir po 24 mėnesių – 11,7 proc. (3.3.1.1 lentelė).

Atlikus EK JP-2 pH matavimus buvo nustatyta, kad rodmuo išliko nepakitęs visą stebėjimo laiką. Skirtingose JP-2 serijose klamos rodmuo statistiškai reikšmingai kito ($p < 0,05$). Vidutiniškai klamos rodmuo realaus laiko stabilumo programoje mažėjo nuo 886,67 iki 786,67 mPa·s. Klampa po 24 mėn. 11,3 proc. sumažėjo visose produkto serijose.

EK CHD-2 mėginių juslinės savybės nepakito 12 mėn. Sukurtos kompozicijos konsistencija buvo homogeniška, tolygi, spalva išliko ryški raudona, kvapas stabilus mėtų eterinio aliejaus (3.3.1.1 lentelė). Stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad EK CHD-2 pH vertės tarp skirtingų serijų buvo artimos ir produkte išliko stabilios 12 mėnesių. Sukurto vilgiklio duomenų skirtumai nustatyti po 24 mėnesių, kai pH vertė sumažėjo iki 5,23 visose serijose ($p < 0,05$) (3.3.1.1 pav.). Tolimesnio stebėjimo laikotarpiu šis produktas kito vizualiai, neišlaikė fizikinių savybių. EK CHD-2 klampumo rodmenys stebėjimo metu mažėjo tolygiai, statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) kitimai nustatyti po šešių mėnesių. Po 12 mėnesių – 2,6 proc., po 24 mėnesių – 3,9 proc. mažėjo klampa produkte. Tarp skirtingų serijų klampos parametrų buvo nustatytas Pearsono koreliacijos koeficientas – $r = 0,96–0,99$, pokyčiai vyko tolygiai visose serijose.

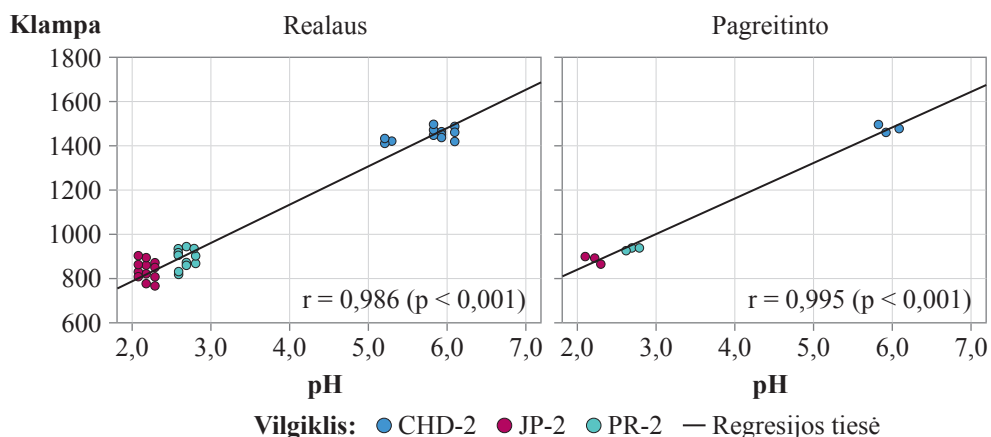
Pateikti 3.3.1.1 pav. pH kitimo duomenys rodo, kad skiriasi vilgiklių pH, o vilgiklių viduje patikimi skirtumai nustatyti tik CHD-2 vilgiklyje.



3.3.1.1 pav. pH palyginimas stabilumo tyrimo pabaigoje

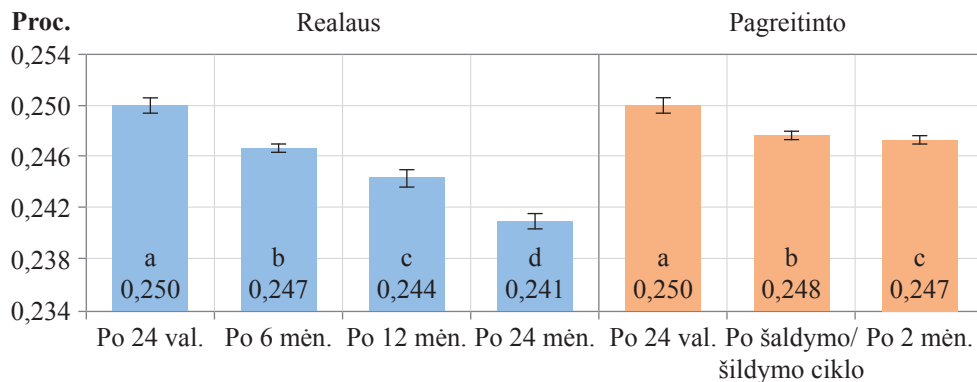
a, b – skirtingomis raidėmis pažymėti vidurkiai skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$, Stjudento kriterijus).

Matuojant sukurtų EK klampą ir pH vertę buvo pastebėta, kad šie dydžiai išlieka tarpusavyje glaudžiai susieti. Atlikus koreliacinę analizę buvo nustatyta (3.3.1.2 pav.), jog yra statistiškai reikšmingi tiesiškai stiprūs ryšiai tarp klampos ir pH visose EK serijose (koreliacijos koeficientas $r = 0,986$ ($p < 0,001$)). Pateikti duomenys paveiksle rodo, kad pH ir klampa labai stipriai susiję, kuo didesnis pH, tuo didesnė klampa ($p < 0,001$).



3.3.1.2 pav. pH ir klamos (mPa·s) tarpusavio priklausomybė

Sukurtų EK mikrobiologinė kokybė buvo vertinama pagaminus ir pavyzdžiuose, kurie buvo saugomi ir tiriami realaus stabilumo programoje numatytais intervalais. Sterilumo sąlygos gamybos metu bei sukurtų formuluočių sudėtyje esantys antimikrobiniai veikimu pasižymintys komponentai sąlygojo, kad EK su jodo povidonu, chlorheksidino digliukonatu, pieno rūgštimi mikroorganizmų augimas buvo nenustatytas. Bendras aerobinių bakterijų skaičius buvo $< 1,0 \times 10^1$ KSV/g (ml). *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* 1 g vilgiklių tiriamosios medžiagos taip pat nenustatyta. Skirtingos sudėties EK bandinių antimikrobinis stabilumas išliko visą tyrimo laiką.



3.3.1.3 pav. Aktyvaus jodo kiekio (proc.) kitimas sukurtoje EK JP-2 realaus ir pagreitinto stabilumo metu

a, b, c, d – skirtingomis raidėmis pažymėti vidurkiai skyrėsi statistškai reikšmingai ($p < 0,05$, Tukey B kriterijus).

Siekiant įvertinti jodo atpalaidavimą iš sukurtos EK, buvo atliktas jodo kiekio tyrimas realaus laiko stabilumo programoje. Jodo kiekis pagaminus vidutiniškai buvo 0,25 proc. (3.3.1.3 pav.), skirtingose serijose kito nuo 0,249 iki 0,251 proc.

Numatytais tyrimo *in vitro* laikotarpiais buvo nustatyta jodo kiekio mažėjimo tendencija. Vidutiniškai bandiniuose jodo kiekis po 6 mėn. vilgiklyje sumažėjo 1,2 proc., po 24 mėn. – 3,6 proc. ($p < 0,05$).

3.3.2. Pagreitinto laiko stabilumo programos rezultatai

Pagamintų EK spalva, homogeniškumas, kvapas pagreitinto stabilumo programos metu išliko nepakitę (3.3.2.1 lentelė). Atlikus centrifugavimo testus tiriamieji produktai nepakito, išliko stabilūs viso tyrimo metu, produkto fazės neatsiskyrė. Šiame tyrimų etape bendras aerobinių mikroorganizmų skaičius 1 g (ml) neviršijo leidžiamų kiekių, pagreitinto stabilumo programos sąlygos, mikrobiologinės taršos neinicijavo.

3.3.2.1 lentelė. EK savybių vertinimo rezultatai pagreitinto stabilumo programoje pagal Colipa „Kosmetikos gaminių stabilumo bandymų gairės” [203]

Vertinimo laikas	Homogeniškumas	Spalva	Kvapas	pH	Klampa, mPa·s	Bendras aerobinių mikroorganizmų skaičius, KSV/g (ml)	Centrifugavimas
PR-2							
Po 24 val.	Homogeniškas	Oranžinė	Pieno rūgštis	2,70±0,06 A	936,7±4,08 A	< 1,0 × 10 ¹	Stabilu
Po šaldymo/šildymo ciklo	Homogeniškas	Oranžinė	Pieno rūgštis	2,70±0,00 A	T/N*	< 1,0 × 10 ¹	Stabilu
Po 2 mėn.	Homogeniškas	Oranžinė	Pieno rūgštis	2,67±0,07 A	T/N*	< 1,0 × 10 ¹	Stabilu
JP-2							
Po 24 val.	Homogeniškas	Rudai oranžinė	Jodo	2,20±0,06 B	886,7±10,8 B	< 1,0 × 10 ¹	Stabilu
Po šaldymo/šildymo ciklo	Homogeniškas	Rudai oranžinė	Jodo	2,20±0,06 B	T/N*	< 1,0 × 10 ¹	Stabilu
Po 2 mėn.	Homogeniškas	Rudai oranžinė	Jodo	2,20±0,06 B	T/N*	< 1,0 × 10 ¹	Stabilu

3.3.2.1 lentelės tęsinys

Vertinimo laikas	Homogeniškumas	Spalva	Kvapvas	pH	Klampa, mPa·s	Bendras aerobinių mikroorganizmų skaičius, KSV/g (ml)	Centrifugavimas
CHD-2							
Po 24 val.	Homogeniškas	Raudona	Mėtų eterinio aliejaus	5,93±0,09 C	1478,3±12,4 C	< 1,0 × 10 ¹	Stabilu
Po šaldymo/šildymo ciklo	Homogeniškas	Raudona	Mėtų eterinio aliejaus	5,93±0,03 C	T/N*	< 1,0 × 10 ¹	Stabilu
Po 2 mėn.	Homogeniškas	Raudona	Mėtų eterinio aliejaus	5,97±0,07 C	T/N*	< 1,0 × 10 ¹	Stabilu

Pastaba: T/N* – tyrimas netaikomas. A, B, C – skirtingomis raidėmis pažymėti vidurkiai stulpelyje (tuo pačiu tyrimo laiku lyginami vilgikliai) skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$, Tukey B kriterijus); pateiktos tiriamųjų savybių vidutinės vertės ir vidurkio paklaidos (vidurkis ± paklaida).

Laikant EK bandinius aukštesnėje temperatūroje, pH vertės nukrypimas nuo pradinės reikšmės buvo nepastebimas (3.3.2.1 lentelė). Taip pat galima teigti, jog šaldant/šildant perioduose bandiniuose su jodu pH vertės pokyčio neatsirado ir šis dydis išliko stabilus. Iš 3.3.2.1 lentelėje pateiktų duomenų matyti, jog apsunkintos eksperimento sąlygos neturi statistiškai reikšmingos ($p > 0,05$) įtakos pH vertei – visų tirtų vilgiklių pH vertė svyruoja stabiliose, būdingose produktui ribose. Tai įrodo EK stabilumą.

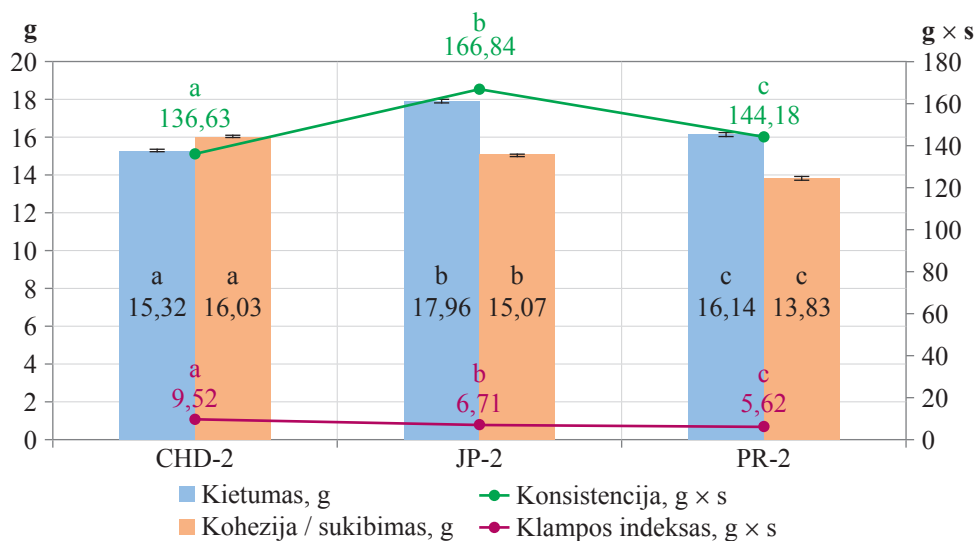
Pagreitinto stabilumo tyrimo metu buvo nustatyta, kad apsunkintos eksperimento sąlygos neturi reikšmingos įtakos sukurtoms EK fizikinėms bei išvaizdos charakteristikoms. EK pagreitinto laiko stabilumo programos metu mikroorganizmų augimas nenustatytas. Bendras aerobinių mikroorganizmų skaičius buvo < 1,0 × 10¹ KSV/g (ml). Skirtingos sudėties EK bandinių antimikrobinis stabilumas išliko visą 2 mėn. tyrimo laiką.

Tyrimas pagreitinto stabilumo programoje parodė, kad pakitusios eksperimento sąlygos įtakoja jodo kiekį. Šaldymo ir šildymo ciklų metu EK jodo kiekis sumažėjo vidutiniškai 0,8 proc. Testuojamų EK JP-2 laikymas du mėnesius +45 °C temperatūroje lėmė jodo kiekio sumažėjimą 1,2 proc. ($p < 0,05$) 3.3.1.3 pav.

3.4. Tekstūros analizės tyrimo rezultatai

Tyrimas buvo atliktas EK (PR-2, JP-2, CHD-2), kurios buvo atrinktos *in vivo* tyrime, buvo įvertintos stabilumo tyrimo programoje, atliktas antimikrobinis efektyvumas.

Remiantis atgalinio išstūmimo testo rezultatais (3.4.1 pav. ir 5 priedas) buvo nustatyta, kad didesniu kietumu ir konsistencija ($p < 0,05$) pasižymėjo EK, kurių sudėtyje buvo ksantano lipai. EK JP-2 buvo nustatytas didžiausias kietumo rodmuo. Didesnis kietumo rodmuo rodo EK JP-2 tvirtumą, ši kompozicija kietesnė, atsparesnė mechaniniams poveikiams. Mažesniu kietumu pasižymėjo EK PR-2 mėginiai, tarp jų buvo nustatyti patikimi statistiniai skirtumai ($p < 0,05$). Analizuojant EK kietumą buvo galima teigti, kad ksantano lipų įterpimas įtakojo kietumo rodiklio parametą, nes EK CHD-2 mėginiai, kurių klampą formavo guaro lipai, buvo mažiau kieti ($p < 0,05$). Tokia pat tendencija nustatyta tiriant EK mėginių konsistenciją. Konsistencijos rodmuo, apibūdinantis produkto tepumo, tirštumo charakteristikas, buvo aukštesnis EK, su ksantano lipais. Tirščiausi buvo EK JP-2 mėginiai (3.4.1 pav.), o EK CHD-2 mažiau tiršti, mažesnio tankumo, nes šio vilgiklio klampą formavo guaro lipai (3.4.1 pav.).

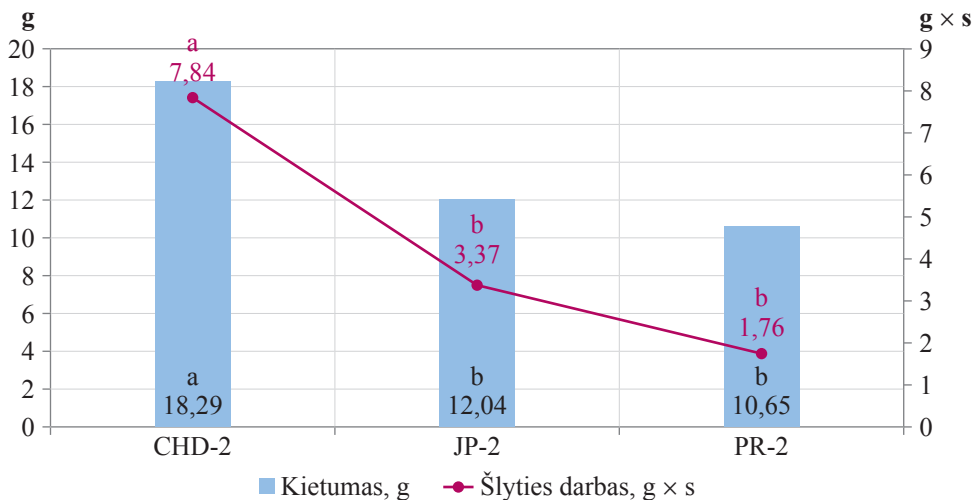


3.4.1 pav. Testuojamų vilgiklių tekstūros analizės duomenys, atlikus atgalinio išstūmimo testą ($n = 3$)

a, b, c – skirtingomis raidėmis pažymėti vidurkiai (tarp CHD-2, JP-2, PR-2 vilgiklių) skiriasi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$).

Iš visų testuotų EK didžiausiu klampos indeksu pasižymėjo EK CHD-2 mėginiai. Mechaninis darbas, reikalingas zondui išimti iš EK CHD-2 mėginio, buvo vidutiniškai $9,52 \pm 0,25 \text{ g} \times \text{s}$ (3.4.1 pav.). Kitoms testuojamoms EK šis mechaninis darbas buvo mažesnis ($p < 0,05$). Didesnis CHD-2 mėginių klampos indeksas parodė mėginio gebėjimą išlikti naudojimo vietoje, mėginys mažiau nubėgs nuo spenio paviršiaus, susidarys pakankamo storio plėvelė, reiks didesnės jėgos vientisumui suardyti. Mažiausias klampos indeksas buvo nustatytas EK PR-2 mėginiuose, todėl iš visų tirtų mėginių PR-2 išliks trumpiausiai naudojimo vietoje (3.4.1 pav.).

Didžiausia kohezijos (lipnumo, sukibimo) reikšmė ($16,03 \pm 0,03 \text{ g}$), t. y. rodmuo gautas atitraukiant zondą iš mėginio giluminių sluoksnių, buvo nustatyta CHD-2 mėginiuose (3.4.1 pav.). CHD-2 kohezijos jėgos rodmuo parodė, kad šioje EK geriausiai produkto dalelės sukibusios tarpusavyje lyginant su kitomis testuojamomis EK, mėginys, paskleistas ant paviršiaus, ilgiau išlieka poveikio vietoje, sudaro tinkamo storio plėvelę. Kohezijos rodiklis nusako lipumą, todėl yra labai svarbus spenio vilgikliams. Tyrimo duomenys leidžia prognozuoti, kad sukurta EK CHD-2 geriausiai laikytusi ant spenio. Guaro lipai suformuoja EK CHD-2 lipnesnę ir optimalaus storio plėvelę, lyginant su ksantano lipų EK JP-2 ir PR-2 suformuota plėvelė ($p < 0,05$).



3.4.2 pav. Testuojamų vilgiklių tekstūros analizės duomenys, atlikus tepumo testą ($n = 3$)

a, b – skirtingomis raidėmis pažymėti vidurkiai (tarp CHD-2, JP-2, PR-2 vilgiklių) skiriasi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$).

Tepumo testas buvo atliktas siekiant nustatyti kietumo ir šlyties jėgos reikšmes, kurios įvertina mėginių pasiskirstymą ant paviršių. Tyrimo rezultatai pateikiami 3.4.2 pav. ir 6 priede. Didžiausias mėginių kietumas ir šlyties jėga buvo nustatyta EK CHD-2 ($p < 0,05$). Gauti tyrimo rezultatai rodo, kad EK CHD-2 mėginių viduje labiausiai didėja sukibimo jėgos, padidėja molekulių sąveika, dėl to CHD-2 ilgiau išliks poveikio vietoje.

EK su ksantano lipais mėginiai (PR-2 ir JP-2) pasižymėjo statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) mažesnėmis kietumo ir šlyties jėgos charakteristikomis. Remiantis tyrimo rezultatais galima teigti, kad PR-2 ir JP-2 trumpiau išliks poveikio vietoje nei CHD-2 mėginiai. Šiuos tyrimo rezultatus pagrindžia ir atgalinio išstūmimo testo rezultatai.

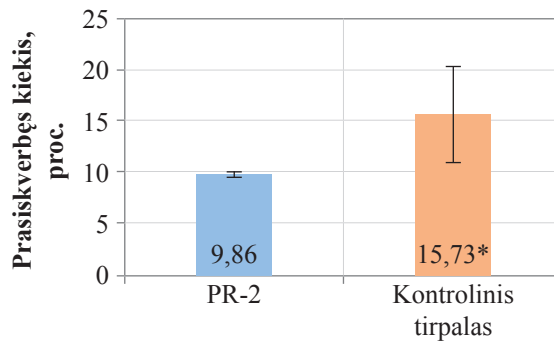
Nustatytos EK kietumo ir konsistencijos charakteristikos parodo, kaip lengvai preparatas pasiskirsto ant tepamo paviršiaus. Mažos šių parametru reikšmės siejamos su lengvu mėginio užtepimu ir lengvu jo išėmimu iš talpyklos. Visos pagamintos EK buvo tinkamos užnešimui ant spenių odos paviršiaus. Nustatytos vertės tarp skirtingos sudėties EK patikimai skyrė ($p < 0,05$). Guaro lipai turėjo įtakos EK tekstūrinėms savybėms, nes mėginio kietumas tvirtumas (1,7–1,5 karto), šlyties jėga (4,4–2,3 karto), kohezija (1,06–1,15 karto) ir klampos indeksas (1,6–1,4 karto) buvo didesni lyginant su EK pagamintoms su ksantano lipais.

3.5. Antimikrobinų medžiagų skvarbos į odą *ex vivo* tyrimo rezultatai

Skvarbai į karvių spenių audinius įvertinti buvo pasirinktos vilgiklių PR-2 ir CHD-2 formuluočių, o kontrolei atlikti buvo naudoti analizuojamų antiseptinių medžiagų (5,04 proc. pieno rūgšties ir 2,5 proc. chlorheksidino digliukonato) metanoliniai (CH_3OH) tirpalai.

Atlikus tyrimus naudojant dujų chromatografiją su masių spektrometrija po metanolinių mėginių derivatizacijos nustatėme, kad pieno rūgštis skverbiasi pro raginį odos sluoksnį. Tyrimo metu po 8 valandų pieno rūgštis kiekybiškai buvo nustatyta spenių odoje. Buvo nustatyta, kad pieno rūgšties iš vilgiklio PR-2 mėginių į karvių spenių odą prasiskverbė $9,86 \pm 0,257$ proc. (buvo nustatyti srautai – $3,96 \pm 0,088$ mg/cm²). Skirtinguose bandiniuose skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas (tyrimo chromatogramos pateikiamos 7–14 prieduose) ($p > 0,05$). Skvarba iš visų bandinių buvo statistiškai reikšmingai mažesnė ($p < 0,05$) lyginant su kontroliniu 5,04 proc. pieno rūgšties metanoliniu tirpalu, kurio buvo nustatyta skvarba į odą $15,73 \pm 4,635$ proc. (buvo nustatyti srautai – $6,22 \pm 1,832$ mg/cm²) ($p < 0,05$). Pieno rūgšties skvarbos iš vilgiklio PR-2 rezultatai pateikti 3.5.1 pav.

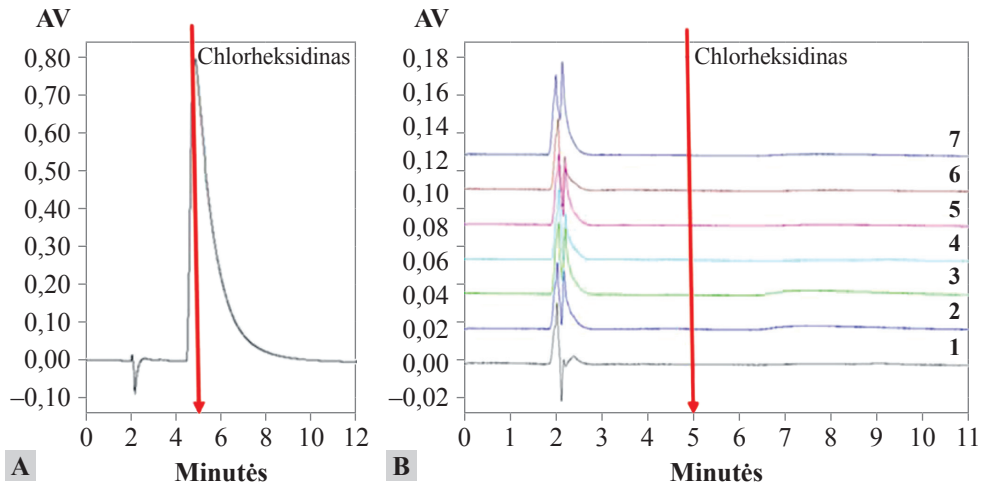
Pieno rūgšties kiekis, aptiktas karvių tešmens odoje, kai ant gyvūno audinio buvo uždedamas PR-2 vilgiklis, buvo statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) 1,6 karto mažesnis nei nustatytas po to kai ant audinio buvo uždedamas kontrolinis pieno rūgšties tirpalas metanolyje. Odos raginis sluoksnis sudarė dalinį barjerą vilgiklio sudedamosioms dalims prasiskverbti.



3.5.1 pav. PR-2 vilgiklio sudėtyje esančios pieno rūgšties skvarbos mėginių tyrimas *ex vivo*, proc. (* $p < 0,05$)

Buvo įvertinta odos barjero įtaka CHD skvarbai iš vilgiklio formuluotės CHD-2. Tyrimas parodė, kad CHD iš EK į odą nepatenka arba skvarba buvo mažesnė už aptikimo ribą tyrime po penkių eksperimentinio kontakto minučių (3.5.2 pav.). Galima teigti, kad CHD patekimas į odą nėra identifikuojamas, nes CHD koncentracija buvo žemiau ultra-efektyviosios skysčių chromatografijos (UESC) metodo kiekybinio nustatymo ribos.

Atlikus skvarbos tyrimus su CHD-2 vilgiklio mėginiais, rezultatai leidžia spręsti, kad chlorheksidinas nesiskverbia į gyvūno odos mėginius ir pilnai lieka ant odos paviršiaus (3.5.2 pav.). Pritaikius *ex vivo* tyrimo metodiką ir UESC chromatogramose po 5 min. chlorheksidino nebuvo nustatyta nei viename tirtame odos mėginyje (3.5.2 pav.).



3.5.2 pav. CHD UESC chromatogramos (kontrolė – skvarba po 5 min.)

A – kontrolė (CHD sulaikymo laikas 5 min); **B** – chlorheksidino iš odos mėginių skvarbos chromatograma (kur 1–7 odos mėginiai).

Pateiktose chromatogramose (3.5.2 pav.) CHD skvarba į spenio odą buvo nenustatyta. Antiseptinės medžiagos atpalaidavimas iš emulsinės vaisto formos priklauso nuo medžiagos molekulių tirpumo ir nuo modeliujamo vilgiklio klampos. Guaro gumos suteikta klampa buvo dvigubai didesnė nei ksantano gumos (kuo didesnė klampa, tuo lėčiau atpalaiduoja vaistinę medžiagą dėl lėto molekulių difuzijos proceso). Polisorbatas yra pažymimas kaip skvarbos skatintojas, bet šiuo atveju, jo poveikis nebuvo ženklaus.

3.6. EK antimikrobinio poveikio *in vitro* su referentinėms mikroorganizmų kultūromis tyrimo rezultatai

Tiriant sukurtų eksperimentinių vilgiklių kompozicijas su pieno rūgštimi, jodo povidonu, chlorheksidinu pagal tarptautinius standartus, buvo nustatyta, kad EK buvo baktericidiškai ir fungicidiškai aktyvios, analizuojant veiksmingumą prieš mikroorganizmus buvo gautas $\log R > 5$ bakterijoms ir $\log R > 4$ grybeliams (3.6.1–3.6.3 lentelės). Tyrimas buvo atliktas su 80, 50 ir 10 proc. EK tirpalais.

3.6.1 lentelė. EK PR-2 (80 proc., 50 proc., 10 proc.) antimikrobinis efektyvumas (log R) pagal UNI EN 1656 ir UNI EN 1657 standartus

Testuojamieji mikroorganizmai	Testuojama suspensija	Rezultatai PR-2		
		80 proc.	50 proc.	10 proc.
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 46–35* N: 4,05 × 10 ⁸ No: 4,05 × 10 ⁷ log No: 7,61	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3,52 log R < 4,09 Ne aktyvu	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3,52 log R < 4,09 Ne aktyvu	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3,52 log R < 4,09 Ne aktyvu
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 42–30* N: 3,60 × 10 ⁸ No: 3,60 × 10 ⁷ log No: 7,56	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,41 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,41 Aktyvu	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3,52 log R < 4,04 Ne aktyvu
<i>E. coli</i> ATCC 10536	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 44–49* N: 4,65 × 10 ⁸ No: 4,65 × 10 ⁷ log No: 7,67	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R < 5,52 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na = 2,15 log R = 5,52 Aktyvu	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3,52 log R < 4,15 Ne aktyvu
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10 ⁻⁵ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁶ : 49–46* N: 4,75 × 10 ⁷ No: 4,75 × 10 ⁶ log No: 6,68	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3,52 log R < 3,16 Ne aktyvu	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3,52 log R < 3,16 Ne aktyvu	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3,52 log R < 3,16 Ne aktyvu
<i>A. niger</i> ATCC 16404	10 ⁻⁵ : > 165 –> 165* 10 ⁻⁶ : 22–20* N: 2,10 × 10 ⁷ No: 2,10 × 10 ⁶ log No: 6,32	Vc: > 165 –> 165 Na < 140 log Na > 3,22 log R < 3,1 Ne aktyvu	Vc: > 165 –> 165 Na < 1650 log Na > 3,22 log R < 3,1 Ne aktyvu	Vc: > 165 –> 165 Na > 1650 log Na > 3,22 log R < 3,1 Ne aktyvu

No – KSV/ml skaičius testuojamojoje suspensijoje; R – gyvybingumo sumažėjimas; Na – KSV/ml skaičius testuojamojoje suspensijoje po produkto antimikrobinio aktyvumo tyrimo procedūros; Vc – gyvybingų mikroorganizmų skaičius; N – KSV/ml skaičius pirminėje testuojamojoje suspensijoje; * – KSV testuojamos suspensijos skiediniuose.

3.6.2 lentelė. JP-2 (80 proc., 50 proc., 10 proc.) antimikrobinis efektyvumas (log R) pagal UNI EN 1656 ir UNI EN 1657

Testuojami mikroorganizmai	Testuojama suspensija	Rezultatai JP-2		
		80 proc.	50 proc.	10 proc.
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 40–46* N: 4,30 × 10 ⁸ No: 4,30 × 10 ⁷ log No: 7,63	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,48 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,48 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,48 Aktyvu
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 40–40* N: 4,00 × 10 ⁸ No: 4,00 × 10 ⁷ log No: 7,60	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,45 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,45 Aktyvu	Vc: 21–16 Na = 185 log Na = 2,27 log R = 5,33 Aktyvu
<i>E. coli</i> ATCC 10536	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 50–45* N: 4,75 × 10 ⁸ No: 4,75 × 10 ⁷ log No: 7,68	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,53 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,53 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,53 Aktyvu
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10 ⁻⁵ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁶ : 48–47* N: 4,75 × 10 ⁷ No: 4,75 × 10 ⁶ log No: 6,68	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 4,53 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 4,53 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 4,53 Aktyvu
<i>A. niger</i> ATCC 16404	10 ⁻⁵ : > 165 –> 165* 10 ⁻⁶ : 30–31* N: 3,05 × 10 ⁷ No: 3,05 × 10 ⁶ log No: 6,48	Vc: > 165 –> 165 Na > 1650 log Na > 3,22 log R < 3,26 Ne aktyvu	Vc: > 165 –> 165 Na < 1650 log Na > 3,22 log R < 3,26 Ne aktyvu	Vc: > 165 –> 165 Na > 1650 log Na > 3,22 log R < 3,1 Ne aktyvu

No – KSV/ml skaičius testuojamojoje suspensijoje; R – gyvybingumo sumažėjimas; Na – KSV/ml skaičius testuojamojoje suspensijoje po produkto antimikrobinio aktyvumo tyrimo procedūros; Vc – gyvybingų mikroorganizmų skaičius; N – KSV/ml skaičius pirminėje testuojamojoje suspensijoje; * – KSV testuojamos suspensijos skiediniuose.

3.6.3 lentelė. EK CHD-2 (80 proc., 50 proc., 10 proc.) antimikrobinis efektyvumas (log R) pagal UNI EN 1656 ir UNI EN 1657

Testuojami mikroorganizmai	Testuojama suspensija	Rezultatai CHD-2		
		80 proc.	50 proc.	10 proc.
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 39–42* N: 4,05 × 10 ⁸ No: 4,05 × 10 ⁷ log No: 7,61	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,46 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,46 Aktyvu	Vc: 189–171 Na = 1800 log Na = 3,26 log R = 4,35 Ne aktyvu
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 38–48* N: 4,30 × 10 ⁸ No: 4,30 × 10 ⁷ log No: 7,63	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,48 Aktyvu	Vc: <14 –<14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,48 Aktyvu	Vc: >330 –>330 Na >3300 log Na > 3,52 log R < 4,11 Ne aktyvu
<i>E. coli</i> ATCC 10536	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 42–46* N: 4,40 × 10 ⁸ No: 4,40 × 10 ⁷ log No: 7,67	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,49 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 5,49 Aktyvu	Vc: 18 –<14 Na < 160 log Na < 2,2 log R > 5,44 Aktyvu
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10 ⁻⁵ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁶ : 38–44* N: 4,10 × 10 ⁷ No: 4,10 × 10 ⁶ log No: 6,61	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 4,46 Aktyvu	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2,15 log R > 4,46 Aktyvu	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3,52 log R < 3,09 Ne aktyvu
<i>A. niger</i> ATCC 16404	10 ⁻⁵ : > 165 –> 165* 10 ⁻⁶ : 28–32* N: 3,00 × 10 ⁷ No: 3,00 × 10 ⁸ log No: 6,48	Vc: > 165 –> 165 Na > 1650 log Na > 3,22 log R < 3,26 Ne aktyvu	Vc: > 165 –> 165 Na >1650 log Na > 3,22 log R < 3,26 Ne aktyvu	Vc: > 165 –> 165 Na > 1650 log Na > 3,22 log R < 3,26 Ne aktyvu

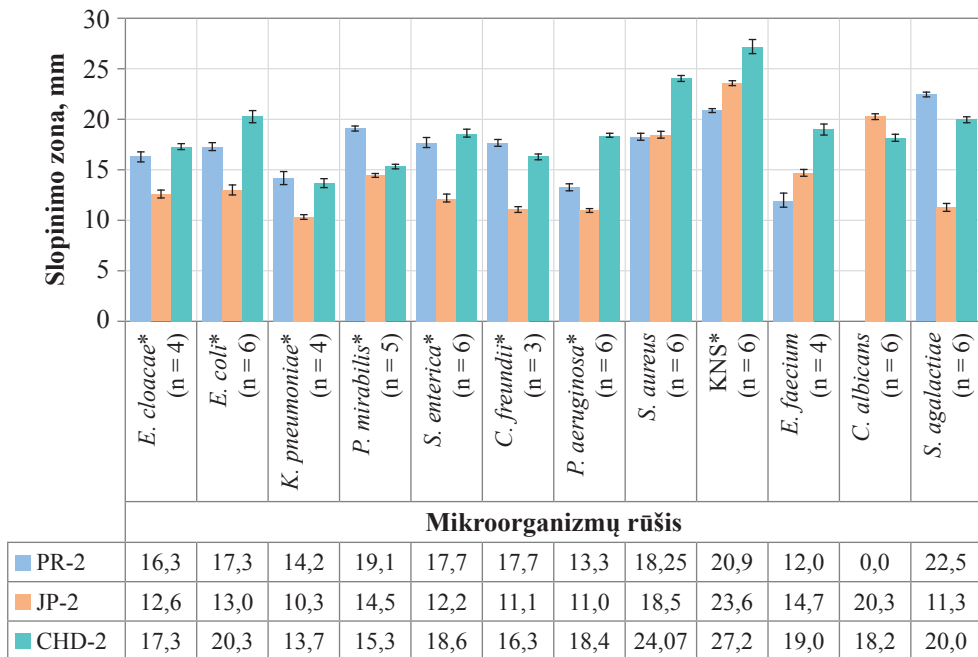
No – KSV/ml skaičius testuojamojoje suspensijoje; R – gyvybingumo sumažėjimas; Na – KSV/ml skaičius testuojamojoje suspensijoje po produkto antimikrobinio aktyvumo tyrimo procedūros; Vc – gyvybingų mikroorganizmų skaičius; N – KSV/ml skaičius pirminėje testuojamojoje suspensijoje; * – KSV testuojamos suspensijos skiediniuose.

Didžiausią antimikrobinį aktyvumą turėjo EK JP-2, kurios sudėtyje buvo 2,36 proc. jodo povidono (aktyvaus jodo kiekis 2500 ppm). Esant ir 10 proc. koncentracijai vilgiklis slopino *S. aureus*, *E. coli* ir *S. uberis* referentinių kultūrų augimą. 80 proc. ir 50 proc. EK CHD-2 tirpalų koncentracijos gerai slopino testuojamų bakterijų augimą, tačiau 10 proc. šio vilgiklio tirpalas buvo veiksmingas tik prieš *E. coli*. Tuo tarpu PR-2 80 proc. ir 50 proc. EK tirpalai buvo antimikrobiškai aktyvūs prieš *E. coli* ir *S. uberis* referentines padermes (log R = 5,52 ir log R > 5,41).

Sukurta EK JP-2 slopino referentinių *C. albicans* padermių augimą. Tuo tarpu EK PR-2 šiai referentinei padermei aktyvumo neparodė, kaip ir 10 proc. EK CHD-2 tirpalas. EK, kurių sudėtyje buvo pieno rūgšties, bakterijų augimą slopino silpniau, lyginant su EK, kurių sudėtyje buvo jodo ar chlorheksidino. Nei viena sukurta EK neslopino referentinių *A. niger* padermių augimo, nepriklausomai nuo antiseptinės medžiagos, esančios EK sudėtyje. Gauti rezultatai yra pateikiami 3.6.1–3.6.3 lentelėse.

3.7. EK antimikrobinio poveikio *in vitro* su klinikinėmis mikroorganizmų kultūromis tyrimo rezultatai

Palyginus testuojamų EK antimikrobinio aktyvumo duomenis *in vitro* buvo nustatyta, kad EK pasižymėjo skirtingu aktyvumu prieš tiriamus mikroorganizmus, aktyviausiai EK slopino *S. aureus* ($20,27 \pm 3,29$ mm), KNS padermes ($23,90 \pm 3,16$ mm) ir mažiau efektyvios prieš gramneigiamas bakterijas ($15,24 \pm 2,94$ mm, $p < 0,05$) (3.7.1 pav.).



3.7.1 pav. Iš gyvūno aplinkos išskirtų mikroorganizmų ($n = 62$) augimo slopinimo zonų dinamika, paveikus sukurtais spenių vilgikliais

* – statistiškai reikšmingi skirtumai tarp mikroorganizmų rūšių ($p < 0,05$).

Vertinant EK tyrimo rezultatus buvo nustatyta, kad testuojama EK, kuri yra aktyvi prieš vieną mikroorganizmą, nebūtinai bus aktyvi prieš kitą. Aktyviausia prieš visas naudotas tyrime bakterijas buvo EK CHD-2, jos veikimas statistiškai patikimai stipresnis ($p < 0,05$) prieš gramneigiamas bakterijas (buvo nustatyta $17,12 \pm 2,22$ mm skaidri zona) ir prieš gramteigiamas bakterijas ($22,57 \pm 3,78$ mm). EK su chlorheksidinu gramneigiamų bakterijų (*E. cloacae*, *P. mirabilis*, *S. enterica*, *C. freundii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) augimą geriau slopino ($p < 0,05$) nei EK su jodu (skaidriosios zonos vidurkis $12,40 \pm 1,3$ mm, $p < 0,05$). Tačiau jos aktyvumas prieš *P. mirabilis* ir *K. pneumoniae* buvo žemesnis (skaidrios zonos vidurkis buvo $14,50 \pm 1,13$ mm, $p < 0,05$) nei EK PR-2 (atitinkamai $16,65 \pm 3,47$ mm) (3.7.1 pav.). Petri lėkštelėse su EK PR-2 buvo nustatyta, kad prieš gramneigiamas ($16,51 \pm 2,08$ mm) ir prieš gramteigiamas ($18,41 \pm 4,62$ mm) bakterijas ji buvo efektyvesnė nei EK su jodo povidonu (atitinkamai $12,10 \pm 1,43$ mm ir $17,02 \pm 5,28$ mm, $p < 0,05$).

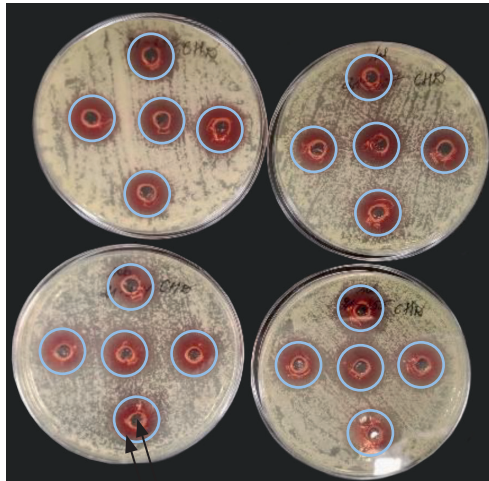
EK JP-2 tyrime buvo efektyvesnis nei kitos testuojamos eksperimentinės kompozicijos prieš mieliagrybį *C. albicans* ($20,3 \pm 0,28$ mm, $p < 0,05$).

Įvertinus aktyvumą prieš *E. faecium* buvo nustatyta, kad testuojamos EK nepasižymėjo išreikštu efektyvumu prieš šį mikroorganizmą. Efektyvesnė buvo EK CHD-2 ($19,00 \pm 0,54$ mm, $p < 0,05$) (3.7.1 pav.). Įvertinus aktyvumą prieš *S. aureus* buvo nustatyta, kad visos sukurtos EK pasižymėjo veikimu prieš šį mikroorganizmą (skaidriųjų zonų vidurkis – $18,25$ – $24,07$ mm, $p < 0,05$). Prieš *E. coli* aktyviausia – EK CHD-2 ($20,30 \pm 0,56$ mm) ir EK PR-2 ($17,30 \pm 0,34$ mm, $p < 0,05$). Prieš KNS buvo aktyvios visos testuojamos EK, buvo nustatytos plačiausios slopinimo zonos – $20,9$ – $27,2$ mm ($p < 0,05$). 3.7.1 pav. pateikti duomenys leidžia teigti, kad efektyviausia EK yra CHD-2, ji pasižymėjo stipriomis antibakterinėmis ir mieliagrybio *C. albicans* augimą slopinančiomis savybėmis.

Įvertinus testuojamų EK aktyvumą prieš *P. zopfii* kultūrą buvo nustatyta, kad EK pasižymėjo skirtingomis savybėmis prieš šį mikroorganizmą. Po 48 val. inkubavimo termostate buvo matuotas augimo slopinimo zonų skersmuo. EK JP-2 aktyviai slopino *P. zopfii* augimą dvi paras. EK JP-2 poveikyje buvo nustatyta vidutinė slopinimo zona – $31,4 \pm 0,9$ mm ($p < 0,05$), negausus dumblio augimas buvo matyti tik pusėje Petri lėkštelių (3.7.2 pav.). Tęsiant inkubavimą termostate dar penkias paras buvo nustatytas lėkštelėse neintensyvus dumblio *P. zopfii* augimas, skaidriosios zonos skersmuo mažėjo iki $26,2 \pm 0,8$ mm. 3.7.2 pav. pateikti duomenys leidžia teigti, kad EK JP-2 pasižymėjo stipriomis *P. zopfii* augimą slopinančiomis savybėmis tyrime *in vitro*, jo veikimas patikimai ($p < 0,05$) buvo efektyvesnis nei kitų testuojamų EK. EK CHD-2 efektyvumas prieš *P. zopfii* buvo ženkliai mažesnis ($p < 0,05$), skaidri zona buvo $19,1 \pm 0,6$ mm. EK PR-2 nebuvo nustatyta poveikio dumb-

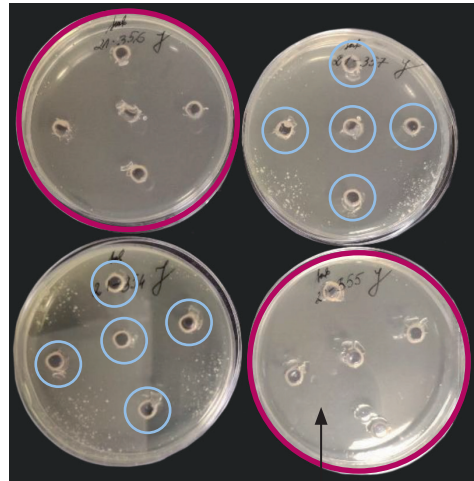
liui *P. zopfii*, nes po 48 val. inkubavimo termostate Petri lėkštelėse dumbliis augo, skaidrių zonų nebuvo. EK su pieno rūgštimi neslopino dumblio *P. zopfii*.

EK CHD-2 poveikis po 48 val.
inkubavimo *P. zopfii*



Skaidri zona / Šulinėlis

EK JP-2 poveikis *P. zopfii* kultūrai
po 48 val. inkubavimo



Visiškas augimo slopinimas

3.7.2 pav. EK poveikio po 48 val. inkubavimo *P. zopfii* padermėms vizualizacija (matomas skaidrios zonos skersmuo, susidaręs aplink šulinėlius) (aut. nuotraukos)

3.8. Sukurtų vilgiklių savybių palyginimas

Sumodeliuoti naujos formuluotės vilgikliai buvo vienalytės homogeninės išvaizdos, reikiamo klampumo, puikiai dengė spenio odą. Turėjo oranžinę, rudai oranžinę ir raudoną spalvas, kas leidžia kontroliuoti spenių antiseptikos atlikimą. Be to, būdingu įterptų augalų ekstraktų ar antiseptinės medžiagos specifiniu kvapu. Sumodeliuotų vilgiklių panašumai, skirtumai, pritaikymas pateikti 3.8.1 lentelėje.

3.8.1 lentelė. Sukurtų EK vilgiklių savybių palyginimas

Eksperimentinės kompozicijos		JP-2	PR-2	CHD-2
Tešmens higienai po melžimo				
Paskirtis	Spenių antiseptika	Antimikrobinis poveikis		
	Spenių odos priežiūra	Drėkina, minkština spenių odą		
	Spenio kanalo uždarymas	Formuoja apsauginį barjerą		
	Apsauga nuo mastito	Prevencinė priemonė		
Sudėtis	Veiklioji medžiaga	Jodo povidonas	L-(+)-pieno rūgštis	Chlorheksidino digliukonatas
	Veikliosios medžiagos koncentracija EK	2500 ppm (aktyvaus jodo)	6,3 proc.	5000 ppm
	Stabilizatorius	Ksantano lipai	Ksantano lipai	Guaro lipai
	Odos minkštiklis, drėkiklis	Glicerolis, sorbitolis	Glicerolis, sorbitolis	Glicerolis
	Augaliniai komponentai	Vaistinių ramunėlių ekstraktas	Vaistinių medetkų ir sėjamųjų avižų ekstraktai	Mėtų eterinis aliejus, kaštonų ekstraktas
Savybės	Spalva	Rudai oranžinė	Oranžinė	Raudona
	Kvapas	Jodo	Pieno rūgšties	Mėtų eterinio aliejaus
	Klampa	850–900 mPa·s	900–950 mPa·s	1450–1500 mPa·s
	pH	2,1–2,3	2,6–2,8	5,8–6,1
Tekstūros savybių palyginimas tarpusavyje				
Kietumas	Kiečiausia EK, atspariausia mechaniniams poveikiams	Kietesnė EK, atspari mechaniniams poveikiams	Minkščiausia EK, mažiau atspari mechaniniams poveikiams	
Konsistencija	Tirščiausia, didžiausio tankumo	Tiršta, didesnio tankumo		Mažiausio tankumo
Klampos indeksas	Mažas klampos indeksas trumpai išliks naudojimo vietoje	Mažiausias klampos indeksas trumpiausiai išliks naudojimo vietoje		Didžiausias klampos indeksas, ilgiausiai išliks naudojimo vietoje
Kohezija (lipnumas)	Produkto dalelės gerai sukibusias tarpusavyje, mėginys išlieka ilgai poveikio vietoje, sudaro tinkamo storio plėvelę	Mažiausia kohezijos (lipnumo) reikšmė, silpniausiai produkto dalelės sukibusias tarpusavyje, mėginys paskleistas ant paviršiaus išlieka trumpiausiai		Didžiausia kohezijos (lipnumo) reikšmė. Geriausiai produkto dalelės sukibusias tarpusavyje, mėginys išlieka ilgiau poveikio vietoje, sudaro tinkamo storio plėvelę

3.8.1 lentelės tęsinys

Eksperimentinės kompozicijos	JP-2	PR-2	CHD-2
Tekstūros savybių palyginimas tarpusavyje			
Tvirtumas (kietumas) ir šlyties jėga	Kietumas ir šlyties jėga mėginių viduje, mažesnė nei CH EK, molekulių sąveika mažesnė, trumpiau išliks poveikio vietoje.	Kietumas ir šlyties jėga mėginių viduje mažiausi, mažesnė molekulių sąveika, trumpiausiai išliks poveikio vietoje.	Didžiausias mėginių kietumas ir šlyties jėga, mėginių viduje labiausiai didėja sukibimo jėgos, padidėja molekulių sąveika, dėl ko EK ilgiau išliks poveikio vietoje
EK antimikrobinio poveikio <i>in vitro</i> testuotoms referentinėms kultūroms (80 proc.)			
Antibakterinis poveikis	Aktyvu (log R > 5)	Aktyvu (log R > 5), išskyrus <i>S. aureus</i>	Aktyvu (log R > 5)
Prieš <i>C. albicans</i> poveikis	Aktyvu (log R > 4)	Neaktyvu (log R < 4)	Aktyvu (log R > 4)
Prieš <i>A. niger</i> poveikis	Neaktyvu (log R < 4)	Neaktyvu (log R < 4)	Neaktyvu (log R < 4)
EK antimikrobinio poveikio <i>in vitro</i> testuotoms klinikinėms kultūroms			
Antibakterinis poveikis	Aktyvus	Aktyvus	Aktyvus
Prieš <i>C. albicans</i> poveikis	Aktyvus	Neaktyvus	Aktyvus
Prieš <i>P. zopfii</i> poveikis	Aktyvus	Neaktyvus	Aktyvus

Sukurti vilgikliai skirti mastito profilaktikai. Visi trys buvo antimikrobiškai aktyvūs prieš testuotas referentines ir iš karvių aplinkos išskirtas bakterijas. Stipresniu antimikrobinio veikimu pasižymėjo JP-2 ir CHD-2. Efektyviausias prieš *P. zopfii* veikimas nustatytas JP-2 vilgikliui. Dėl suformuoto pakankamo ksantano (850–950 mPa·s) ir guaro (1450–1500 mPa·s) lipų klampumo naujieji vilgikliai tolygiai dengė spenius, laikėsi reikiamą laiką, formavo apsauginį barjerą. Be to, sudėtyje esančios medžiagos glicerolis, sorbitolis bei augalinių vaistinių medžiagų priedai drėkina, minkština, saugo spenių odą. Skirtingos sudedamosios dalys formavo vilgiklių tekstūrinės savybes, kaip lipumą, sukibimą, tirštumą, kietumą. Tirščiausi, kiečiausi, atspariausi mechaniniam poveikiui ksantano lipų sudėtyje turintys JP-2 ir PR-2 naujieji vilgikliai. Guarų lipų sudėtyje turintis CHD-2 vilgiklis buvo lipniausias ir klampiausias.

4. TYRIMŲ REZULTATŲ APTARIMAS

Lietuvos pienininkystėje per 10 metų didėjo melžiamų karvių bandos, o kontroliuojamų karvių bandose iš karvės primelžiamo pieno kiekis išaugo 27 proc. Didesnio produktyvumo karvės yra imlesnės tešmens infekcijai, o tešmens sveikatingumas ir kokybiška pieno produkcija nulemia pieno vertę. Mastito sukėlėjų, kurie kolonizuoja karvių spenius, skaičius turi tendenciją didėti didėjant karvių bandai [23, 210, 211]. Karvių mastito profilaktikai, SLS ir BBS sumažinimui žaliaviniame piene svarbu naudoti vilgiklius po melžimo. Naudojant vilgiklius spenių kanalai yra apsaugomi nuo mikroorganizmų patekimo. Naujų vilgiklių po melžimo kūrimas, išbandymas, pritaikymas yra gyvulininkystės specialistų lūkesčių ir poreikių patenkinimas, o tai nuolatinis iššūkis mokslui ir mokslo bendradarbiavimui su verslu.

Naujai sukurtuose spenių vilgikliuose yra tokių komponentų kaip tirštiklis, antimikrobinė veiklioji medžiaga, drėkinamieji ir spenių odą saugantys ingredientai bei pagalbinės technologinės medžiagos. Daugiausia dėmesio buvo skirta spenių vilgiklių svarbiausiems parametrams, t. y. antimikrobiniam efektyvumui ir reologinėms savybėms, kad antiseptinė medžiaga išlaikytų tinkamą sąlytį su spenio oda, nenutekėtų. Antiseptinė medžiaga yra vienas svarbiausių spenių vilgiklių komponentų. Disertaciniame darbe, kuriant vilgiklių prototipus, antimikrobinės medžiagos pasirinktos vadovaujantis Lietuvos teisės aktais [93] ir Europos Sąjungos reglamentu [5] bei žaliavų gamintojų rekomendacijomis [212], nes jos yra skirtos veterinarinių preparatų gamybai, tarp jų – ir vilgiklių po melžimo. Skirtingų veikliųjų medžiagų naudojimas spenių vilgikliuose užtikrina platų antiseptikos spektrą, tačiau atkreipiamas dėmesys, kad daugelyje komercinių produktų, be dažniausių veikliųjų medžiagų (jodo, vandenilio peroksido, chloro, chlorheksidino), yra junginių, kurie gali sukelti odos dirginimą ir atsparumą bakterijoms [7, 8]. Todėl kuriant naujus produktus ar ruošiant cheminius mišinius svarbu išvengti minėtos problemos – kuriamas produktas turi būti nekenksmingas gyvūnui ir aplinkai. Spenių vilgikliams, kaip ir kitiems odos paviršiaus antiseptikams, cheminio mišinio klasifikavimas yra labai svarbus. Modeliuojant naujos formulės spenių vilgiklius atsižvelgta į antimikrobinės medžiagos klasifikaciją pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 [87]. Pieno rūgšties pasirinkimą vilgiklyje PR-2 nulėmė tai, kad ji yra plačiai naudojama veterinarijos srityje, pasižymi aktyvumu prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas, nėra toksiška ar pavojinga medžiaga, be to, nesukelia odos alerginės reakcijos, nedirgina. Fitzpatrick ir bendra autorių [54] tyrime teigiama, kad spenių mirkymo tirpalai su pieno rūgštimi apsaugo spenių kanalą nuo galimų infekcijų ar uždegimų, o susidariusi plėvelė veiksminga iki pirmojo plovimo.

Vilgiklis PR-2 padengė spenio odą tolygia plėvele, lygiu sluoksniu, formuojamos plėvelės likučiai buvo matomi ir po 12 val., o atlikti tyrimai *in vitro* parodė vilgiklio PR-2 antimikrobinį efektyvumą.

Kita antiseptinė medžiaga, kuri pasirinkta vilgiklyje JP-2, yra jodo povidonas, nes jodas ir jo junginiai taip pat plačiai pritaikomi veterinarinėje medicinoje. Vienas plačiausiai paplitusių naudojimo būdų – karvių spenių antiseptika prieš ir po melžimo proceso. Nurodoma, kad vilgikliuose jodo pagrindu optimali aktyviosios medžiagos koncentracija – 0,5–1,0 proc. [213, 214]. Palyginus vilgiklių veiksmingumą, kuriuose buvo skirtinga jodo koncentracija (1 proc., 0,25 proc. ir 0,1 proc.), tyrime nenustatė reikšmingo skirtumo tarp naujų mastito atvejų pasireiškimo skirtingose grupėse, bei, kad veikliosios medžiagos koncentracija vilgiklyje nekoreliuoja su antimikrobinium efektyvumu [215]. Sumodeliuotas vilgiklis JP-2, turintis aktyviosios medžiagos tik 0,25 proc., kaip parodė atlikti tyrimai *in vitro*, buvo efektyvus prieš referentines ir kliniškes mikroorganizmų padermes ir tuo pačiu ekonomiškai, nedidelės savikainos.

Be to, kaip teigiama tyrimuose, didesnės kaip 1 proc. jodo koncentracijos spenių vilgikliai ženkliai padidina jodo kiekį piene (80–100 µg/l) [213]. Jodas gali sukelti spenių odos dirginimą, todėl vilgiklyje būtini odą tausojantys komponentai. Tuo tikslu panaudoti glicerolis, sorbitolis, vaistinių ramunių ekstraktas, kurie taip pat suteikė išskirtinumo prieš kitus rinkoje esančius vilgiklius. Reikia pastebėti, kad vilgiklio su jodu privalumas tai, kad jodas suteikia ryškią rudą spalvą, dėl kurios antiseptikas yra lengvai pastebimas ant odos. Be to, vilgiklyje panaudotas jodo povidono kompleksas užtikrina jodo stabilumą ir maksimalų antiseptinių savybių išlaikymą produkte, ką ir patvirtino atlikti aktyvaus jodo kiekio tyrimai stabilumo programų metu bei *in vitro* antimikrobininių savybių tyrimai. EK JP-2 (2,36 proc. jodo povidono) suformavo stabilią kokybišką barjerinę plėvelę, kuri, kaip nurodyta kitų tyrėjų darbuose [115], yra svarbi mažinant kliniškinių ir subkliniškinių mastitų atvejų skaičių bandoje.

Vilgiklyje CHD-2 kaip antiseptinė medžiaga tešmens higienai po melžimo parinktas chlorheksidino digliukonatas. Šio antiseptiko pasirinkimą lėmė tai, kad chlorheksidinas nepatenka į gyvūninės kilmės produktus, jam nenustatyta išlauka, be to, chlorheksidinas gali būti naudojamas ir spenių odos antiseptikai, ir pažeidimams gydyti. Chlorheksidinas gerai veikia daugumą gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų, pasižymi plačiu antimikrobinium poveikiu, nedirgina odos. Ši medžiaga yra vienas plačiausiai naudojamų antiseptikų veterinarijoje ir gyvulininkystėje. Tai stiprus bakterijų membraną veikiantis agentas, slopinantis bakterijų sporų augimą. Jis pasižymi dideliu aktyvumu prieš *E. coli* [81, 216]. Vianna ir kt. [217], Gilbert, Moore [218] ir Brookes ir kiti [219] tyrė CHD skirtingų koncentracijų (0,2 proc., 1 proc. ir

2 proc.) antimikrobinį aktyvumą prieš patogeninius mikroorganizmus ir nustatė, kad 2 proc. CHD buvo baktericidiškai aktyvus prieš *S. aureus* ir *C. albicans* po 15 s poveikio. Jų duomenimis, baktericidinis poveikis *E. faecalis* kultūrai fiksuojamas per 1 min. Evans ir kiti [220], Babickaitė ir kiti [221] tyrė skirtingų koncentracijų CHD vilgiklį ir gelį. Jie atkreipė dėmesį, kad norint pasiekti laukiamą rezultatą svarbiausi veiksniai yra tinkama chlorheksidino koncentracija ir sąlyčio laikas. Atlikti tyrimai su EK CHD-2 šiuos teiginius patvirtino, nes naudota sąlyginai maža (0,5 proc.) CHD koncentracija, be pridėtinių kitų antimikrobinų medžiagų, pasižymėjo išreikštu antimikrobinu efektyvumu prieš daugumą testuotų referentinių ir klinikinių mikroorganizmų padermių.

Be antiseptinio poveikio, svarbus vilgiklio klampumas, t. y. reologinis spenių vilgiklio parametras, atspindintis produkto kokybę [11, 85]. Todėl savo tyrime daug dėmesio skyrėme klampos gavimui. Modeliuojamų kompozicijų kūrimo *in vitro* ir bandymo *in vivo* metu buvo iškeltas uždavinys keičiant ir parenkant guaro, ksantano lipų koncentracijas sukurti efektyvius, veiksmingus ir ekonomiškai naudingus spenių vilgiklius tešmens higienai po melžimo. Sudarant kompozicijų receptūras visada svarbu produkto kokybiškumas, stabilumas bei ekonomiškumas. Dėl šios priežasties, vadovaujantis žaliavos tiekėjo nustatytomis ribomis, bandymai atlikti nuo žemiausios koncentracijos ir ji vis didinta, kol buvo pasiekta pageidaujama klampa sunaudojant optimalų tirštiklio kiekį. Nustaćius pageidaujamą eksperimentinės kompozicijos klampą, parinkus dažiklius ir augalinius komponentus, buvo atliktas tyrimas *in vivo*, kuris leido atrinkti technologiškai optimalias, ekonomiškas modeliuojamų vilgiklių kompozicijas. Atlikus tyrimą *in vivo* su eksperimentinėmis vilgiklių kompozicijomis atrinktos labiausiai išsikeltus tikslus atitinkančios kompozicijos, kurios ant spenio sudarė vientisą ir gerai matomą apsauginę plėvelę, padengė spenio odą, laikėsi nustatytą laiką ir nudažė spenių odą reikiama kontrolei spalva. Tokiu tyrimu buvo išsiaiškinta, kokia tirštiklio koncentracija reikalinga, kad būtų gaunamas parametrus atitinkantis klampus tirpalas, kuris sudarytų stabilią plėvelę ant spenio paviršiaus, kad ant karvės spenių užtepus šias priemones susidarytų n nubėgantis lašas, kuris laikui bėgant sudžiūtų ir sudarytų patvarų barjerą, saugantį spenio kanalą nuo mikroorganizmų.

Vilgiklių klampa reguliuojama skirtingų tipų tirštikliais, pasirenkami natūralūs, pusiau sintetiniai arba sintetiniai polimerai, kurie pasižymi skirtingomis fizikinėmis savybėmis [10]. Pagal tyrėjus, jie parenkami kaip stabilizuojančios, emulsijas formuojančios medžiagos, be to, pagerinančios produkto tekstūrinės savybes. Kuriant vilgiklius pasirinkti natūralios kilmės tirštikliai, kurie, ištirpę vandenyje, sudarė tankų hidrofilinių polimerų tinklą, dėl to susidarė pakankamą klampą turintys tirpalai. Panaudoti tirštikliai tyrime

in vivo pasižymėjo geromis plėvelę sudarančiomis savybėmis (formavo fizinių barjerą), o tai ypač svarbu kuriant veterinarinius spenių apsaugos produktus. Be to, guaro ir ksantano lipai nepavojingi žmogaus sveikatai ar aplinkai ir pagal reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 nėra klasifikuojami [87].

Kuriant eksperimentines formuluotes su pieno rūgštimi ir jodo povidonu pasirinkti ksantano lipai, o vilgikliui su chlorheksidinu – guaro lipai dėl gamintojo praktinių rekomendacijų, geresnio suderinamumo su antimikrobine medžiaga [212]. Ksantano lipų specifikacijoje nurodomas koncentracijos intervalas yra platus – 0,5–2,5 proc. Ištirti kiekvienos koncentracijos šiame intervale klampumą užtruko daug laiko, bet reikalingos klampos koncentracijos intervalas buvo išbandytas *in vivo* ir nustatyta kaip pakankama 0,67 proc. koncentracija. Kaip nurodo tyrėjai, ksantano lipai yra tirpūs aukštos ir žemos temperatūros vandenyje. Šio polimero tirpalai pasižymi unikalia savybe išlaikyti stabilius klampos parametrus didinant temperatūrą [132].

Guaro lipai atlieka ne tik tirštiklio vaidmenį, bet ir sudaro apsauginę plėvelę, formuoja emulsijas ir stabilizuoja gaminį kūrimo metu [85]. Gaminiuose naudojamų guaro lipų kiekis svyruoja nuo 0,1 iki 0,3 proc. [222]. Naudojome hidroksipropilo guaro polimerą $C_3H_8O_2 \times$ (izomerą), kuris yra išgrynintas ne joninis guaro dervos darinys. Jis veikia kaip puikus tirštiklis kosmetikos preparatuose, kuriuose yra daug polinių tirpiklių. Jis taip pat veikia kaip O/V emulsijos stabilizatorius ir ypač naudingas stabilizuojant emulsijas, kuriose yra alkoholio [212]. Dėl savo polimerinės struktūros šis guaro darinys palieka švelnų pojūtį po užtepimo ant odos [222]. Tyrimo metu hidroksipropilo guaro lipų modeliuojamame vilgiklyje pakako 0,89 proc. Ši tirštiklio koncentracija išlaikė sumodeliuoto produkto fizikines savybes stabiliose ribose, t. y. stebint 1 metus po pagaminimo. Tyrėjai nurodo, jog guaro lipai tirpalą pradeda tirštinti, kai pH reikšmė yra žemiau 6,0, o guaro lipų tirpumas ir klampos sudarymo laipsnis didėja mažėjant dalelių dydžiui, pH ir kylant temperatūrai [129]. Tačiau svarbiausia šio tirštiklio charakteristika – gebėjimas išbrinkti ir suteikti tirpalui klampą žemoje temperatūroje. Todėl sumodeliuota kompozicija su CHD veiksminga esant iki $-5\text{ }^\circ\text{C}$ aplinkos temperatūrai. Tyrėjai taip pat teigia, kad guaro lipų polimeras yra stabilus plačiame pH reikšmių intervale, kai tirpalai yra laikomi kambario temperatūroje. Greitas tirštumo sumažėjimas pastebimas rūgštinėje terpėje, esant aukštai temperatūrai [130]. Mūsų atveju modeliuojamų PR-2 ir JP-2 vilgiklių tiek realaus laiko, tiek apsunkintomis tyrimo sąlygomis pH ribos išliko nepakitę, o taip pat ir klampos rodmuo kito neženkiai.

Kumar ir kiti [194] nurodo, kad pagalbinių medžiagų parinkimas yra svarbus kuriant išoriškai ant odos naudojamus produktus. Kiekvienas ingredientas gaminyje atlieka savo funkciją. Tinkamai parinkus pagalbines

medžiagas galima veiksmingai suformuoti stabilias sistemas. Modeliuojant vilgiklių formuluotes izopropilo alkoholis ir polisorbatas 20 buvo pasirinkti kaip technologinės medžiagos, kurios puikiai maišosi su kitais ingredientais. Ši izopropilo alkoholio savybė leidžia jį naudoti tirpinant daugelį organinių junginių, jis dažnai naudojamas kaip tirpiklis farmacijoje ir kosmetikoje [170, 171]. Šis alkoholis taip pat naudojamas kaip antiseptinė priemonė, nes neleidžia daugintis mikroorganizmams [223].

Kaip emolientai buvo pasirinkti glicerolis ir sorbitolis, nes šios medžiagos intensyviai drėkina ir minkština spenių odą, apsaugo nuo nepalankių aplinkos sąlygų, atkuria barjerinę odos funkciją. Šios medžiagos ypač dažnai aptinkamos veterinariniuose produktuose, kurie skirti naudoti ant odos paviršiaus. Glicerolis drėkina raginį odos sluoksnį, didina elastingumą, saugo nuo išorinių dirgiklių, gerina žaizdų gijimą. Yra duomenų, kad glicerolis taip pat gali turėti antimikrobinį poveikį [137]. Dažikliai skirti tam, kad būtų paliktas įrodymas, jog higiena po melžimo atlikta. Kosmetikoje ir maisto pramonėje naudojamų dažiklių parinkimas modeliuojant EK vilgiklius PR-2 ir CHD-2 pasiteisino, nes suteikė ryškia, stabilią spalvą, derėjo su kitomis sudedamosiomis dalimis, nesikristalizavo.

Modeliuojant vilgiklius dėl juslinių savybių, didelio antioksidacinio ir antimikrobinio aktyvumo bei savitų naudingųjų biologiškai aktyvių medžiagų juose buvo panaudoti augalų ekstraktai. Augalų ekstraktai ir jų veikliosios medžiagos įeina į farmacinių produktų sudėtį dėl antioksidacinių, priešuždegiminių, antibakterinių, žaizdų gijimą skatinančių savybių ir kitų žinomų biologinių poveikių. Literatūroje nurodoma, kad augaliniai ekstraktai odos priežiūros priemonių gamyboje gali pakeisti sintetinius konservantus. Kai kurie augaliniai ekstraktai praturtina antioksidantais, apsaugo nuo mikroorganizmų augimo ir vystymosi 3 mėnesius. Augaliniai ekstraktai ir jų komponentai gali būti naudojami kaip technologinę funkciją atliekantys ingredientai (klampos modifikatoriai, konservantai, paviršiui aktyvios medžiagos), siekiant pakeisti ar sumažinti sintetinių ingredientų kiekį farmacinėse formose. Teigiama, kad augalinių ekstraktų įterpimas į emulsijos sudėtį sustiprina emulsijos stabilumą, kokybę [224].

Sėjamųjų avižų sėklų (*Avena sativa* L.) ekstraktas buvo pasirinktas ir įterptas į vilgiklio PR-2 sudėtį dėl gerai žinomų ir moksliniais tyrimais įrodytų odą minkštinančių ir drėkinančių savybių [169, 225] bei dėl augalinės kilmės β -gliukanų antioksidacinio, odos gijimą skatinančio, drėkinančio poveikio odai, bet ir atlieka technologinę funkciją – modifikuoja farmacinio ar kosmetinio produkto klampą [167]. Pasirinktą nulėmė duomenys, kad daugianarės emulsijos, stabilizuotos augaliniais ekstraktais, kambario temperatūroje neišsisluoksniuoja net 2 metus, pagerėja pagrindo savybės ir mėginių stabilumas. Vaistinių medetkų ekstraktas minkština odą, dėl augale esančių

flavonoidų turi priešūždegiminių savybių. Kaštonų ekstraktas stiprina tešmens odos kraujagysles, normalizuoja kraujotaką, mažina spenių pabrinkimą, dėl sudėtyje esančio escino veikia priešūždegimiškai. Kaštonų ekstraktas gerina odos elastingumą, padeda sergant odos ligomis, be to, β -escinas lemia prieš-edemini ir vazoprotekcinį poveikį, kuris slopina uždegimą, mažina patinimą ir malšina skausmą [163, 164]. Ramunėlių ekstraktas turi antiseptinių, antibakterinių ir priešgrybelinių savybių, ramina sudirgusią odą, skatina odos ląstelių atsinaujinimą, veikia kaip švelni antiseptinė priemonė, regeneruoja odą, mažina niežulį. Mėtų eterinis aliejus maloniai vėsina odą, atbaido vabzdžius, veikia priešūždegimiškai, pasižymi specifiniu dezodoruojančiu kvapu ir užtikrina vėsinantį, stimuliuojantį, šildantį ir gaivinantį poveikį [226]. Jis sąveikauja su šalčiui jautriais TRPM8 receptoriais odoje, kurie yra atsakingi už vėsinimo efekto jutimą [227]. Mėtų eterinio aliejaus sudedamoji dalis mentolis turi antiseptinių, antivirusinių savybių, kurios stabdo mikroorganizmų ir grybelių augimą [228]. Augaliniai priedai naujose vilgiklių formulotėse parinkti terapiniam poveikiui sustiprinti, spenių odos vėsinimui, drėkinimui ir minkštinimui. Tai svarbu, nes preparatai, kurie veikia odos paviršiuje, turi pasižymėti antiseptiniu ar apsauginiu poveikiu [229].

Naujų vilgiklių formuluočių kūrimo metu vadovautasi Europos cheminių medžiagų agentūros parengtomis biocidinių produktų reglamento gairėmis [87]. Pagal jas spenių vilgiklis turi pasižymėti stabiliais fizikiniais rodikliais, t. y. kompozicijos stabilumas turi išlikti visą produkto galiojimo laikotarpį, nes nesant pakankamam stabilumui vilgiklis gali prarasti antiseptines savybes. Be to, norint Europos Sąjungoje įregistruoti biocidinių produktą būtina pateikti stabilumo tyrimų rezultatus, pagal kuriuos nustatoma biocidinio produkto galiojimo trukmė. Stabilumo tyrimų svarba yra apibrėžta reglamentu (ES) Nr. 528/2012 [5]. Stabilumo įvertinimas yra sunkiausia užduotis modeliuojant naujas formuluotes. Siekiamybė yra sumodeliuoti tokią kompoziciją, kuri laikymo metu išlaiko savo struktūrą bei vilgymo metu lengvai pasiskirsto ant odos. Stabilumo tyrimai įvertina produktų kokybę viso galiojimo laiko metu. Produktui nesant stabiliam veikliosios medžiagos gali chemiškai pakisti ir produktas gali prarasti antiseptines savybes. Kai sumažėja klampa vilgiklyje, nesusiformuoja plėvelė ant spenio odos, kuri išlaiko aktyviausias medžiagas sąlyčio vietoje. Tiek realaus laiko, tiek pagreitinto stabilumo programos testai skirti patikimai įvertinti šiuos aspektus: gaminių fizinių ir mikrobiologinį stabilumą. Atlikus EK mėginių stabilumo tyrimus ir įvertinus gautus rezultatus nustatyta, kad vilgikliai išlaikė stabilumą rekomenduojamomis ir stresinėmis sąlygomis, mėginių pH ir klampumo rezultatai buvo stabilūs, t. y. laikymo sąlygos neturėjo reikšmingos įtakos reologinėms savybėms ir fizinei produkto išvaizdai. Realaus laiko stabilumo tyrimas, kuris paprastai trunka dvejus metus, svarbus, kad būtų įmanoma vertinti fizikinių savybių pokytį ir

leidžia pagrįsti biocidinio produkto tinkamumo naudoti terminą. PR-2 ir JP-2 vilgikliai išlaikė savo stabilias fizikines savybes dvejus metus. Sumodeliuotų vilgiklių spalva, homogeniškumas ir kvapas stabilumo programų metu išliko nepakitę, neatsiskyrė produkto fazės. Kitų mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad klampa mažėja ilgėjant laikymo trukmei [230]. Sumodeliuotų CHD-2, PR-2 ir JP-2 vilgiklių formuluočių tyrimo metu tai buvo patvirtinta ($p < 0,05$), be to CHD-2 vilgiklis realaus laiko programose stabilus buvo tik metus. Sukurto vilgiklio duomenų skirtumai nustatyti po 24 mėnesių, kai pH vertė sumažėjo iki 5,2–5,3 visose serijose ($p < 0,05$). Tolimesnio stebėjimo laikotarpiu šis produktas kito vizualiai, neišlaikė fizikinių savybių.

Produktui, kuris naudojamas ant odos, yra labai svarbus pH, nes veikia įprastas odos ląstelių funkcijas, turi įtakos epidermio apsauginėms funkcijoms, keratinizacijos procesams, sudaro palankias sąlygas vegetuoti įprastai odos mikrobiotai [229, 231]. Modeliuojamų vilgiklių formuluočių pH reikšmės abiejose stabilumo tyrimo programose nereikšmingai keitėsi į rūgštinę pusę, o pagreitintos eksperimento sąlygos neturi statistiškai reikšmingos įtakos pH vertei – PR-2 ir JP-2 vilgiklių pH vertė svyravo stabiliose, produktui būdingose ribose. Sumodeliuotose formuluočiuose stebėtas klampos parametras kitimas, bet vilgikliai laikymo metu neprarado pirminės struktūros. Modeliuojamuose spenių vilgikliuose mikrobiologinis užterštumas realaus laiko ir pagreitinto stabilumo programų metu nebuvo aptiktas. Farmacinių produktų mikrobiologinė kokybės kontrolė yra būtina siekiant užtikrinti jų saugą aplinkai, gyvūnams ir juos naudojančių sveikatai.

Gaminant spenių vilgiklius siekiama, jog jų tekstūra pasižymėtų estetiška išvaizda ir tinkamomis mechaninėmis savybėmis – tolygiai ir lengvai pasiskirstytų ant paviršiaus, tam tikrą laiką tarpą išliktų naudojimo vietoje, būtų patogų produktą paimti iš talpyklos. Tekstūros analizės metu gauti duomenys apibūdina svarbiausius produktų fizikinius mechaninius parametrus, pagal kuriuos galima objektyviai vertinti preparatų juslines savybes. Tekstūros analizės tyrimas atliktas siekiant nustatyti, kuris iš tiriamųjų preparatų mėginių pasižymi geriausiomis ir naudojimui priimtinausiomis tekstūros savybėmis, juos tarpusavyje palyginti. Sumodeliuoto vilgiklio JP-2 su jodo povidonu ir ksantano lipais mėginiai buvo kietiausi, tvirtiausi, tirsčiausi. Vilgiklio CHD-2 mėginiams nustatyta didesnė kohezijos jėga, vadinasi, mėginiai lipnesni, gerai laikysis ant spenio, sudarys plėvelę. Tai vienas pagrindinių tekstūros reikalavimų vilgikliams. Be to, vilgiklio CHD-2 mėginių klampos indeksas buvo didžiausias, parodė mėginio atsparumą atsiskyrimui ir nubėgimui. Kuo didesnė ši vertė, tuo didesnės jėgos reikia mėginiui suardyti ir mėginys n nubėgs nuo spenio, susidarys pakankamo storio plėvelė. Vietiškai ant spenio naudojamiems vilgikliams rekomenduojama rinktis sudėtis, pasižyminčias mažesniu kietumu ir mažesne konsistencijos reikšme, tačiau dides-

nėmis klamos indekso ir kohezijos reikšmėmis. Tokie preparatai tolygiai pasiskleis ant spenio, sudarys tinkamo storio ir tvirtumo plėveles, ilgiau išliks poveikio vietoje. Todėl apibendrinant tekstūros analizės rezultatus nustatyta, kad geriausiomis tekstūrinėmis savybėmis pasižymėjo EK CHD-2. Šiuos tyrimo rezultatus pagrindžia tiek tepumo, tiek atgalinio išstūmimo testo rezultatai.

Siekiant išanalizuoti antiseptinių medžiagų skvarbos į odą galimybes buvo atliktas skvarbos į odą *ex vivo* tyrimas iš antiseptinių medžiagų standartų tirpalų bei iš pasirinkto vilgiklio. Tyrimai atlikti lyginant skvarbą į sveiką spenių odą. Gauti rezultatai parodė, jog prasiskverbęs į odą CHD kiekis buvo mažesnis už nustatymo ribą. Mūsų tyrimo duomenys sutampa su kitų autorių duomenimis, paskelbtais mokslinėje literatūroje. Kakadia ir Conway [232] nurodo, jog chlorheksidino digliukonatas (CHD) yra plačiai naudojamas antiseptikas, skirtas odos lokalinei antiseptikai, nes pasižymi maža skvarba į odą. Jų tyrime po 24 valandų poveikio CHD buvo nustatytas tik odos viršutiniuose 100 μm pjūviuose (7,88±1,37 μg/mg), dar mažesni kiekiai nustatyti (mažiau nei 1 μg/mg) 300 μm gylyje. Nebuvo nustatyta CHD prasiskverbimo per visą odos storį. Kirkby su bendraautoriais [233] nurodo, kad vandeninis CHD tirpalas prasčiau nei tirpalas izopropilo alkoholyje prasiskverbia į gilesnius odos sluoksnius. Autoriai mažą CHD skvarbą į odą aiškina junginio didele molekuline mase (897,8 g/mol), mažu log P (0,0133) ir jonizacijos būseną esant fiziologinei pH reikšmei, mažu CHD ir kitų sudedamųjų dalių afinitetu. Tyrėjai taip pat teigia, kad CHD koncentracijos didinimas preparate padidina CHD prasiskverbimą *in vitro*. Jų nuomone, didesnė vaisto koncentracija ant odos paviršiaus padidina spontanišką dalelių judėjimą iš didelės koncentracijos srities (odos paviršius) į mažos koncentracijos sritį (gilesni odos sluoksniai). Be to, autorių teigimu, padidėjęs vaisto klampumas sumažina laisvą vaisto dalelių judėjimą formuluotėje, sumažina vaisto dalelių sąveiką su odos paviršiumi, tuo pačiu mažiau difunduoja per barjerą. PR-2 ir CHD-2 vilgikliuose klampa skyrėsi. Mūsų sumodeliuotame vilgiklyje CHD-2 guaro lipai suteikė produktui 1,6 karto didesnę klampą nei PR-2 vilgiklyje su ksantano lipais. Pieno rūgštis iš PR-2 vilgiklio skvarba buvo patikimai žemesnė nei kontrolinio tirpalo. Tačiau pieno rūgštis skvarba į odą iš vilgiklio PR-2 buvo statistškai reikšmingai didesnė nei vilgiklio su CHD-2. Vilgiklio PR-2 sudėtyje yra beveik du kartus didesnis glicerolio kiekis bei sorbitolio priedas. Pastarosios medžiagos gali veikti kaip cheminis skvarbos skatintojas, išstumdamas vandens molekules iš tarpląstelinės erdvės, padidindamas medžiagų pasiskirstymo koeficientą ir tirpumą raginiame sluoksnyje. Tai hipotezė, kurią ateityje reiktų tirti. Be to, iš vilgiklio PR-2 per 8 val. prasiskverbė 9,86 proc. pieno rūgštis. Tai inicijuoja papildomus tyrimus, kokios įtakos pieno rūgštis skvarbos kinetikai turėjo vilgiklio klampa bei

kitos farmakologinės sudėties medžiagos. Kobayashi ir kiti [234] teigia, kad rūgštys gali prasiskverbti į odą dėl savo mažos molekulinės masės, o absorbcija linkusi didėti, kai pH mažėja. Jų tyrime patvirtinta, kad skvarba į odą didžiausia, kai junginyje yra L-pieno rūgšties, etanolio ir izopropilo miristato derinys (LEI sistema). L-pieno rūgšties arba etanolio sąveika padidino raginio sluoksnio pralaidumo koeficientą. Tyrejai priėjo prie išvados, kad izopropilo miristatas daugiausia darė poveikį raginio sluoksnio lipidų domenui; etanolis padidino vaisto prasiskverbimą į visą odos sritį; L-pieno rūgštis paveikė raginio sluoksnio vandeninį domeną ir po jo esantį sluoksnį.

Tyrimas *ex vivo* leido įvertinti ir palyginti antiseptinių medžiagų atpalaidavimą iš skirtingos sudėties vilgiklių. Pasitelkiant šį tyrimo metodą galima optimizuoti vietinio poveikio spenių vilgiklių sudėtis, atrinkti sudedamąsias dalis, parinkti vaistines medžiagas, kurios neskatinėtų skvarbos ir veikliąsias medžiagas paliktų neperėjusias raginio sluoksnio. Moksliniai tyrimai, tyrinėjantys skvarbos į odą procesus su skirtingomis medžiagomis, teigia, kad afiniteto laipsnis tarp tirpiklio ir besiskverbiančio komponento yra vienas svarbiausių faktorių, lemiančių skvarbą į odą [233]. Todėl komponuojant vilgiklių sudėtis labai svarbu įvertinti visų sudedamųjų dalių kaip skvarbos skatintojų vaidmenį. Be to, tyrime ateityje reikia analizuoti vilgikliuose esančių augalinių priedų skvarbos rezultatus, jų skvarbos įtaką į odos paviršinius ar gilesnius sluoksnius.

Ne visi karvių spenių antiseptikai po melžimo veiksmingi [235], todėl prieš pradėdant juos naudoti gamybinėmis sąlygomis pirmiausia reikėtų iširti *in vitro* ir nustatyti, kaip šios medžiagos veikia ūkyje vyraujančius mastitų sukėlėjus. Tyrime, kurį atliko Fitzpatrick ir kiti [54], buvo nurodyta, kad Europos Sąjungos valstybėse narėse turi būti bendras spenių antiseptikų vertinimo standartas. Europos standartas BS EN 1656 ir BS EN 1657 naudojamas įvairioms dezinfekcinėms ir antiseptinėms priemonėms palyginti. Atlikome tyrimą pagal šiuos standartus sumodeliuotiems vilgikliams. Mūsų sukurti spenių vilgikliai turėjo antimikrobinį poveikį. Tiriant pagal EN standartus vilgiklių 80 proc. ir 50 proc. koncentracijos turėjo baktericidinį aktyvumą etaloninėms kultūroms ($\log R > 5$). Efektyviausias antimikrobinis poveikis nustatytas sumodeliuotam vilgikliui JP-2. Pastarojo vilgiklio 80 ir 50 proc. koncentracijos slopino *S. aureus* ($\log R > 5,48$), *S. uberis* ($\log R > 5,45$), *E. coli* ($\log R > 5,53$) ir *C. albicans* ($\log R > 4,53$) padermių augimą, šio vilgiklio 10 proc. koncentracija taip pat buvo efektyvi, tačiau neveikė prieš *A. niger* grybelio padermę. Vilgiklio PR-2 80 proc. ir 50 proc. tirpalai efektyvūs prieš *S. uberis* ir *E. coli* padermes. Mažos 10 proc. vilgiklių koncentracijos buvo mažesnio antimikrobinio efektyvumo. Visi trys sumodeliuoti spenių vilgikliai gali būti vertinami kaip perspektyvi priemonė karvių tešmens infekcijų, kurias sukelia daugybė bakterijų rūšių ir tik kai kuriais atvejais –

grybeliai, profilaktikai. Apibendrinus mikrobiologinių tyrimų su referentinėmis mikroorganizmų kultūromis rezultatus sukurtiems vilgikliams dar atlikti papildomi tęstiniai mikrobiologiniai tyrimai su klinikinėmis mikroorganizmų padermėmis iš karvių aplinkos. Tyrime vilgikliams nustatytas išreikštas antimikrobinis veikimas prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas, mieles. Didesniu antimikrobinio efektyvumu EK slopino *S. aureus*, KNS padermes. Tačiau, priklausomai nuo testuojamoje EK sudėtyje esančios antimikrobinės medžiagos, aktyvumas prieš skirtingus mikroorganizmus įvairavo. Aktyviausia prieš visas naudotas tyrime bakterijas buvo EK CHD-2. Ši EK su chlorheksidinu gramneigiamų bakterijų augimą geriau ($p < 0,05$) slopino nei EK su jodu. Tačiau jos aktyvumas prieš *P. mirabilis* ir *K. pneumoniae* buvo žemesnis nei EK PR-2. Sumodeliuotas vilgiklis JP-2 pasižymėjo efektyvumu prieš *S. aureus*, KNS, *C. albicans* bei ženkliai išreikštomis prieš *P. zopfii* savybėmis tyrime *in vitro*. Kai tuo tarpu vilgikliui PR-2 nenustatyta poveikio dumbliui *P. zopfii*.

Per pastaruosius metus tyrėjai analizavo daugelį spenių vilgiklių, jų sudėtis, efektyviausias antimikrobinės medžiagos. Daugiausia analizuojama pieno rūgštis, jodo povidonas, chlorheksidinas. Airių mokslininkų atliktame išsamiaame tyrime [54] nurodoma, kad vilgikliai su chloro dioksidu ir jodu ar 1,6 proc. m/m pieno rūgšties ir vandenilio peroksidu veiksmingiausiai sumažino streptokokų kiekį ant spenių. Taip pat vilgikliai su jodu ir pieno rūgštimi ar pieno rūgšties ir 0,6 proc. m/m chlorheksidinu sudėtyje, lėmė didžiausią stafilokokų sumažėjimą. Vilgikliai, kurių sudėtyje yra 2,4 proc. pieno rūgšties, 0,29 proc. jodo arba 0,8 proc. pieno rūgšties ir 0,5 proc. jodo veiksmingiausi prieš *S. uberis* padermes. Jų tyrime konstatuota, kad nenustatyti reikšmingi skirtumai tarp veiksmingumo ir veikliųjų medžiagų koncentracijos vilgiklyje. Vilgikliuose PR-2, CHD-2, JP-2 parinktos nedidelės veikliųjų medžiagų koncentracijos suformulavo optimalų modelį su pakankamu antimikrobinio efektu.

Sukurti originalios skirtingos sudėties karvių tešmens higienai po melžimo skirti vilgikliai. Šių tyrimų pagrindu pradėti gaminti PROFIDIP linijos produktai (gamintojas UAB Ruvera). Sukurti produktai buvo pirmieji Lietuvoje, sudarę konkurenciją įvežtiniams spenių vilgikliams. Vilgiklių kūrimo metu atlikti fizikiniai, mikrobiologiniai ir klinikiniai biofarmaciniai tyrimai, nustatant vilgiklių stabilumą, reologines ir tekstūrines savybes, antiseptinių medžiagų skvarbą į odą, antimikrobinį efektyvumą. Gauti tyrime rezultatai yra svarbūs sėkmingai karvių spenių higienai po melžimo skirtų produktų, naudojamų ant odos, kūrimui ir optimizavimui. Remiantis atliktais tyrimais, gautais rezultatais, ateityje bus siekiama kurti vilgiklius, natūralių ir ekologiškų medžiagų pagrindu, būtinus tvarios pieninės gyvulininkystės plėtotei. Tyrimų tęstinumas būtų vilgiklio atitinkančio reglamento ES 2021/1165

modeliavimas ir vertinimas. Atlikti tyrimai įrodė, kad antiseptinės medžiagos, esančios vilgiklių sudėtyje, skirtingai veikia antimikrobiškai, todėl prieš naudojimą būtina įvertinti ūkyje cirkuliuojančių patogeninių mikroorganizmų paplitimą. Gauti biofarmacinių tyrimų *ex vivo* rezultatai pagrindžia ir įvertina antiseptinių medžiagų bei vilgiklio klampą formuojančių sudedamųjų dalių skvarbos į odą skirtumus ir dėsningumus.

IŠVADOS

1. Eksperimentinių tyrimų metu sumodeliuotos devynios eksperimentinės kompozicijos (EK), derinant skirtingas antimikrobines medžiagas (pieno rūgštį (PR-1, PR-2, PR-3), jodo povidoną (JP-1, JP-2, JP-3) ir chlorheksidino digliukonatą (CHD-1, CHD-2, CHD-3) su natūraliais tirštikliais, dažikliais ir augaliniais ekstraktais.
2. EK PR-2 ir JP-2 (ksantano lipų kiekis sudėtyje – 0,67 proc.) ir EK CHD-2 (guaro lipų kiekis sudėtyje – 0,89 proc.) palyginamojo tyrimo metu pasižymėjo geriausiomis reologinėmis savybėmis: matomai nudažė bei tolygiai padengė spenių odą, lašas laikėsi nustatytą laiką ir formavo fizinį barjerą.
3. Nustatyta, kad:
 - 3.1. EK PR-2 ir JP-2 (kambario temperatūroje) išlieka stabilios ne mažiau nei 24 mėn., o CHD-2 – ne mažiau kaip 12 mėnesių laikotarpį. Visose EK tarp klamos ir pH parametrų nustatyti statistiškai reikšmingi tiesiškai stiprūs ryšiai (koreliacijos koeficientas $r = 0,986$ ($p < 0,001$)).
 - 3.2. Geriausiomis tekstūros savybėmis pasižymėjo EK CHD-2, kurioje klampa suformuluota hidroksilpropilo guaro lipų pagalba. Tai lėmė mažesnę produkto tirštumą ir tankumą ($p < 0,05$), tačiau tuo pačiu jis buvo lipnesnis ir ilgiau išliekantis ant spenio paviršiaus. Guaro lipai lėmė galimybę EK CHD-2 formuoti lipnesnę ir optimalaus storio plėvelę.
 - 3.3. Nustatyta skirtinga antiseptinių medžiagų skvarba į karvių spenių odą:
 - 3.3.1. pieno rūgštis skverbiasi į spenių odą iš EK PR-2 1,6 karto ($p < 0,05$) mažiau, nei iš kontrolinio pieno rūgšties tirpalo metanolyje. Odos raginis sluoksnis sudarė dalinį barjerą vilgiklio antimikrobinei medžiagai prasiskverbti;
 - 3.3.2. chlorheksidinas iš CHD-2 vilgiklio nesiskverbia į spenio odą ir lieka ant odos paviršiaus, užtikrindamas lokalią spenių odos antiseptiką.

4. Nustatyta, kad:

- 4.1. EK PR-2, JP-2 ir CHD-2 buvo baktericidiškai ir fungicidiškai aktyvios nustatant poveikį referentinėms bakterijų ir mieliagrybio *C. albicans* kultūroms, tik referentinė grybelio *A. niger* padermė buvo atspari testuojamiems vilgikliams;
- 4.2. antimikrobiškai aktyviausia yra EK JP-2, net ir 10 kartų atskiesta ši EK slopino referentinių kultūrų *S. aureus*, *E. coli* ir *S. uberis* augimą;
- 4.3. EK PR-2, JP-2 ir CHD-2 buvo efektyvesnės prieš kliniškes *S. aureus* ir KNS padermes, tačiau silpniau veikė gramneigiamas bakterijas, tuo tarpu, EK CHD-2 turėjo platų veikimo spektrą ir buvo efektyvi prieš visas tirtąsias bakterijas;
- 4.4. patogeninius dumblius (*P. zopfii*) geriausiai veikė EK JP-2.

REKOMENDACIJOS

1. Atrinktus eksperimentinius vilgiklių prototipus su skirtingomis veikliosiomis medžiagomis rekomenduojama naudoti komercinių preparatų gamybai.
2. Komercinį vilgiklį, pagamintą prototipo JP-2 jodo povidono pagrindu, rekomenduojama naudoti karvių spenių antiseptikai, bandoje, kurioje mastitus sukelia *S. aureus*, KNS, *S. uberis*, *P. zopfii* ir *C. albicans*.
3. Komercinį vilgiklį, pagamintą prototipo CHD-2 chlorheksidino pagrindu, rekomenduojama naudoti, kai tarp mastitus sukeliančių mikroorganizmų dominuoja *S. aureus* bei aplinkos patogeniniai mikroorganizmai, kaip *S. agalactiae*, KNS, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. enterica*, *C. freundii*, *E. faecium*, *P. zopfii*, *C. albicans*.
4. Komercinį vilgiklį, pagamintą prototipo PR-2 pieno rūgšties pagrindu, rekomenduojama rinktis, kai mastitus sukelia aplinkos patogeniniai mikroorganizmai, tokie kaip *S. agalactiae*, KNS, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. enterica*, *C. freundii*, *E. faecium*.

SUMMARY

1. INTRODUCTION

Dairy products occupy an important place in the human diet; therefore, milk must be of the highest quality. Milk processing companies and dairy farmers are faced with problems. One of them is mastitis, high somatic cell count (SCC) and total bacteria count (TBC), which are caused by the conditions of keeping and hygiene of cows, and milking technologies. Bacterial contamination of milk can be reduced by up to 90% and mastitis rate – up to 50–75%, depending on the hygiene and sanitation condition of the farm and the method of udder preparation. In order to prevent the spread of infection on farms, various measures are used to prevent mastitis. One of such measures is teat antiseptics, performed before and after milking [1]. Various sprays, cleaners and teat dips are used for this purpose. The most widely used procedure is teat dipping. This procedure is considered an essential method for reducing the number of bacteria on the teat skin and in the milk.

When the teat is dipped in antiseptic teat dip, a drop of this solution forms on the end of the teat, acting as a physical barrier, which protects the udder from infection. Teat dips protect the teat canal between milkings, preventing the spread of infectious and environmental mastitis etiological factors, and destroys microorganisms on the skin of the teats [1–3].

According to the description of Ózsvári and Ivanyos [4], a dip for teat hygiene after milking must have antimicrobial properties, have suitable viscosity, be adhesive, hold well on the surface of the teat and cover it evenly. In addition, it must form a barrier film to prevent pathogenic microorganisms from entering the teat, not to irritate the skin, while the substances in the composition must moisturise the skin of the teats so that it is soft, does not crack, and heals faster. In addition, the teat dip must be visible on the teat, therefore, it must contain a colourant or its active ingredient must give colour to the product.

Antiseptic teat dips for the hygiene of the udder and teat skin of cows after milking are biocidal products, the placing on the market and use of which is regulated by European Union Regulation (EU) No 528/2012 [5] concerning the placing on the market and use of biocidal products, as well as other related EU regulations and Lithuanian legislation. These documents specify which active substances manufacturers may use in the production of biocidal products.

An effective antiseptic agent must act quickly and ensure a broad spectrum of antimicrobial activity, without causing damage to the teat skin

and without leaving inhibitors in the milk. The use of different active substances in biocides guarantees a wide range of antiseptic properties. The most commonly used active substances in veterinary biocides are chlorhexidine, iodine and its complexes, lactic acid, hydrogen peroxide and peracetic acid [1, 6–8].

There are three main requirements for udder teat dips to be developed: first, the composition must include a bactericidal active substance; second, skin-protecting components; and third, viscosity-forming substances. After dipping the skin of the teat, a solid film should be formed, which will protect the teat canal from the entry of infectious microorganisms. The viscosity of teat dips is regulated by choosing different types of thickeners and their different concentrations [9–11].

Teat dips are created by selecting broad-spectrum antibacterial agents with bacteriostatic and bactericidal effects against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

The teat dip must cover the teat well, without forming a film that is too thick. Viscosity-regulating agents give the teat dip the right consistency, allowing the solution to remain on the teat for a sufficiently long time. Furthermore, the teat dip must be characterised by stable physical and chemical parameters, a constant concentration of the active antiseptic substance and compatibility of the components [12, 13]. Teat dips must ensure not only protection against pathogenic microorganisms, but also skin hydration and softening. Dyes and plant extracts are also used, which provide colour, fragrance and have an anti-inflammatory and skin-friendly effect.

Lithuanian market offers products for post-milking teat and udder hygiene. However, it is noted that unauthorised and insufficiently effective teat dips are used on dairy farms. The creation of new teat dips is encouraged by the developing resistance of bacteria to antiseptics used on farms, and the negative drying effect of these products on teat skin is also indicated. In the opinion of livestock specialists, there is a lack of teat dips the quality and efficiency of which would be based on scientific research, and which would be safe for animals and the environment, and be characterised by sustainability.

The aim of the study

To create experimental prototypes of post-milking teat dips for dairy cows from combinations of organic materials, and to evaluate the compliance of their properties with the requirements that cover teat dips.

Objectives of the study

1. To create experimental compositions of teat dips by combining antimicrobial substances (lactic acid, chlorhexidine digluconate, iodine povidone) with natural thickeners, dyes and plant extracts.
2. To determine the rheological properties of experimental teat dips *in vivo*.
3. To determine the teat dips stability, texture and penetration of antimicrobial agents into the teat skin.
4. To determine the antimicrobial effect of experimental teat dips on reference and clinical cultures of microorganisms.

Scientific novelty

For the first time, antimicrobial substances (lactic acid, chlorhexidine digluconate, iodine povidone) were combined with natural thickeners, dyes and plant extracts.

According to the original methodology, the influence of the concentration of gums and dyes on the rheological properties of teat dips was studied *in vivo*. For the prototypes of the teat dips being developed, combinations of natural skin-softening and skin-protecting plant extracts and essential oils were used, which provide the products with sustainability and have a complex antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and wound healing-promoting effect.

For the first time, complex studies have determined the functionality, rheological and textural properties, penetration of antiseptic substances into the skin and antimicrobial efficiency of the newly developed teat dips.

For the first time, the influence of natural origin gums on the textural properties of newly developed teat dips was determined, and the influence of guar and xanthan gums on the viscosity, stickiness, strength, and stable film formation of lubricants was evaluated.

For the first time, when assessing the properties of antiseptic substance penetration into the skin, an *ex vivo* experiment used the skin of cow teats, the composition and structure of which is different from that of animals (pigs, guinea pigs, rats, mice and rabbits), which are very often used for *ex vivo* studies of substance penetration into the skin) or bioengineered skin.

For the first time, a comparative *in vitro* evaluation of antimicrobial effects was performed on the teat dips developed in Lithuania with reference and clinical cultures of microorganisms.

Practical significance

New sustainable teat dips for post-milking teat hygiene with different antiseptic substances, different viscosity-forming adhesives, natural plant extracts, dyes, and excipients have been formulated and introduced to the market. When using teat dips, it is appropriate to evaluate their effectiveness against circulating pathogenic microorganisms on a specific farm.

The results of the conducted studies are important for the further development and improvement of products for post-milking teat hygiene in cows. The obtained results of the texture study confirm the relationship between the rheological properties of the formulations and the type of viscosity-forming liposomes. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that xanthan gum and guar gum can be reasonably used in the created teat dips at economic concentrations lower than recommended by manufacturers.

The obtained results of *ex vivo* biopharmaceutical studies justify the differences in the skin penetration of antiseptic substances and the viscosity-forming components of the teat dip. Using this study method, it is possible to optimise the composition of topical teat dips and select ingredients that would not promote penetration and thus prevent antimicrobial substances from reaching the deeper layers of the skin.

New products have been created (PROFIDIP line of teat dips; manufacturer: UAB Ruvera), production technology has been improved, products have been introduced in dairy farms in Lithuania and abroad, dissemination is carried out at practical seminars, conferences and trainings.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Time, place, and plan of research

The experimental part of the study was carried out between 2017 and 2024 at the new product development and research laboratory of Ruvera UAB (Šiauliai, Lithuania), a commercial dairy farm (Šiauliai District, Lithuania), LSMU VA Institute of Microbiology and Virology (Kaunas, Lithuania), Chelab S.R.L. laboratory (Resana, Italy), LSMU Faculty of Pharmacy laboratory (Kaunas, Lithuania) and National Public Health Surveillance laboratory (NVSPL) (Vilnius, Lithuania). The study was conducted in compliance with the requirements for keeping, caring for and using animals destined for scientific and educational purposes [202]. The work plan is presented in Fig. 2.1.1.

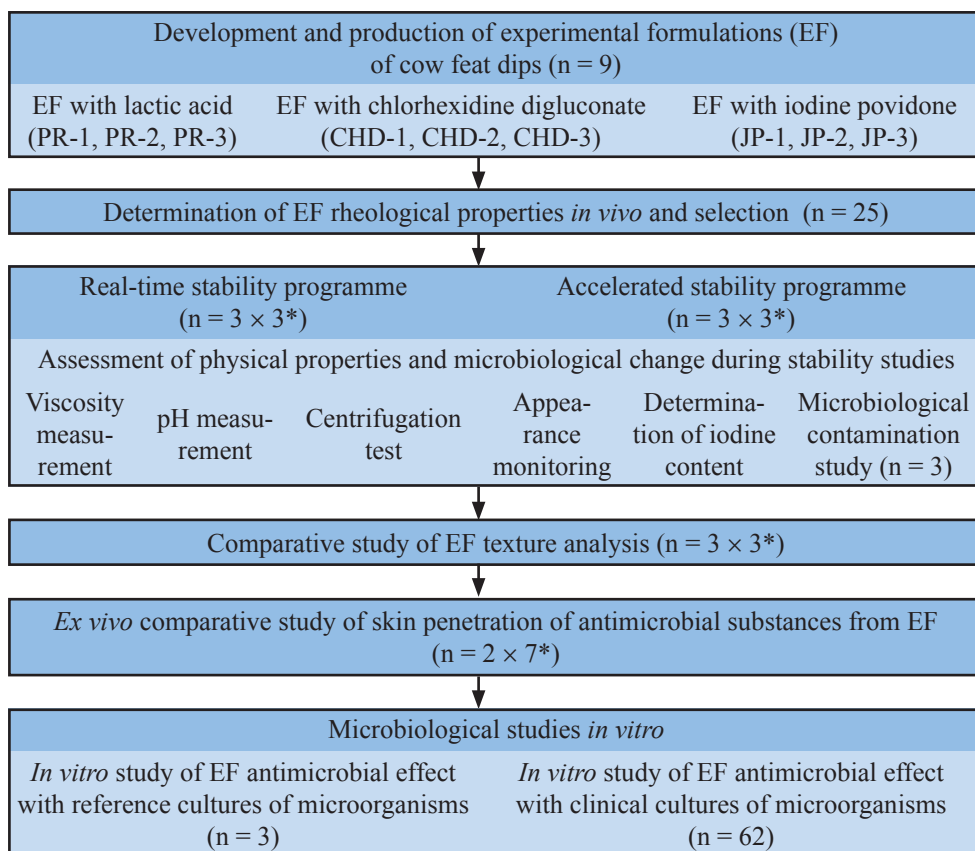


Fig. 2.1.1. Work plan

* – number of repeated measurements in the study.

2.2. Development and production methodology of experimental formulations (EF) of teat dip

Teat dips EF were developed based on data provided in the literature, recommendations of component manufacturers, remarks of specialists working in production and taking into account the data of previous production tests.

Three different antimicrobial agents (lactic acid, chlorhexidine digluconate and povidone iodine) were used in the study and 9 EFs were developed and produced for further studies, i.e. 3 different EFs for each antimicrobial agent.

2.3. Methodology for evaluation of EF rheological properties *in vivo*

The *in vivo* study was conducted to assess the compliance of the developed and laboratory-produced experimental formulations with the provided requirements. An *in vivo* study was performed on 75 cows; i.e. to evaluate three EF with the same antimicrobial substance three test groups of 25 cows each were made. Later, the study was repeated to evaluate other EF, with two other antimicrobial substances. After milking, the udders of the cows were immediately dipped in EF solutions up to 3/4 of the teat length. During this study, visual indicators were evaluated according to the original methodology [55]. During the *in vivo* study, the values of the study indicators were recorded in the protocols by visually applying a 5-point system. Three EF compositions with different antibacterial substances with the highest scores were selected for further study. Evaluation criteria: colour intensity, visibility; dripping immediately after dipping; formation of a drop on the tip of the teat; covering the teat with a film; evenness of nipple coverage.

2.4. Stability programme methodology

The EF stability testing process was carried out based on the Colipa guidelines: Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products [203]. Two stability programs were carried out: real-time and accelerated stability, during which the parameters of the change in EF physical properties and microbiological contamination were studied and evaluated. The number of samples required for study was set aside in accordance with the anticipated research plan prepared in advance. Samples were selected and taken in accordance with LST EN ISO 9001 (Quality Management System) and LST EN ISO 227716 (Good Manufacturing Practices for Cosmetic Products) standards [204, 205].

During **real-time** stability studies, the product was stored at a temperature of 25 ± 2 °C at a relative weather humidity of $60\pm 5\%$, and changes in product properties were monitored in 24 hours, 6, 12 and 24 months after manufacturing. When testing the product in an **accelerated program**, the samples were stored in climate chambers Binder KBF (Binder GmbH, Germany), i.e. in sealed containers; applicable test intervals: in 24 hours after manufacturing the product; after 2 months of storage at $+45$ °C (relative weather humidity – $75\pm 5\%$); after cooling/heating cycle (10 days stored at $+4$ °C; 10 days stored at $+45$ °C; 10 days stored at $+4$ °C; 10 days stored at $+45$ °C; 10 days stored at $+15$ °C (relative weather humidity – $75\pm 5\%$)). Tests during stability programmes are designed to reliably assess the following aspects: physical properties and microbiological stability, and determine EF shelf life.

2.5. Assessment of physical properties and microbiological change during stability studies

2.5.1. Viscosity measurement methodology

The viscosity value of each EF was determined 24 hours after production and during the stability testing after 6, 12 and 24 months. The EF dynamic viscosity of teat dips was measured at a temperature of 20 °C with a rotary viscometer NDJ-1 (COMECTA S.A., Italy). Measurements were performed using the standard test method (STM), which was prepared according to the device instructions and the European Pharmacopoeia [177]. The results were presented in terms of absolute viscosity.

2.5.2. pH measurement methodology

Measurements were performed using a pH-meter InoLab pH 7310 (Xylem Analytics Germany GmbH, Oberbayern, Germany). The measurement methodology was developed according to the device instructions and the European Pharmacopoeia [177]. Principle: potentiometric method. The results are presented after deriving the arithmetic mean of the data obtained during the study.

2.5.3. Centrifugation test methodology

The EF centrifugation test was performed in 24 hours after production, after a cooling/heating cycle and after 2 months of storage at +45 °C. The centrifugation test was performed with an EBA 20 laboratory centrifuge (Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Germany), centrifuged for 8 minutes at 4500 rpm. To evaluate the stability of the solution formulation, phase separation and turbidity were observed.

2.5.4. Monitoring of product appearance

Odour, colour and homogeneity were evaluated using STM prepared according to the European Pharmacopoeia [177]. Colour and homogeneity tests were performed in the Light Booth (Byko-Spectra basic, JAV) using the visual method. The odour rating is provided by indicating the characteristic odour of that product. The results are presented indicating the obtained evaluation result.

2.5.5. Iodine content determination methodology

The chemical test was carried out by the Iodometric method. The amount of iodine in % was calculated according to the following formula:

$$Q = 12.69 \times \frac{c \times V}{m}$$

where: m – sample mass, g;
V – volume of nitrated sodium thiosulfate, ml;
c – sodium thiosulfate concentration mol/L.

2.5.6. Methodology for examination of bacterial contamination

The methodology was prepared according to the valid articles of the European Pharmacopoeia: 20612 Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests, 20613 Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified microorganisms [177].

2.6. Methodology of a samples texture analysis study

Back extrusion and spreadability tests have been performed [189]. The hardness, consistency, cohesiveness and viscosity index of the samples were analysed during the back extrusion test, as well as the firmness and work of shear during the spreadability test. By evaluating the indicators of these characteristics, it was possible to objectively evaluate the sensory characteristics of the substance and the influence of the composition of the substance on the texture properties of the product. The hardware used in the research – texture analyser *Stable Micro Systems Texture Analyzer TA.XT plus* (United Kingdom). The results were evaluated with the computer programme Exponent (programme version – 6.1.5.0, United Kingdom). A graph was drawn in the Exponent programme window, which shows the obtained test readings. The test was repeated three times and the results obtained were averaged.

2.7. Methodology of *ex vivo* skin penetration of antimicrobial substances testing

For the skin penetration test, cow udder skin samples were used, which were stored at a temperature of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for a period no longer than 6 months prior to testing. For the *ex vivo* skin penetration test, Bronaugh-type flow-through diffusion cells were used. Diffusion cells with cow udder skin samples (1.77 cm^2) were placed on a special heating block maintained at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The effective diffusion area in the cell was 0.64 cm^2 . EF solution ($0.51 \pm 0.01\text{ g}$), as a donor phase, was applied to the cow's teat skin for a the period

of 8 hours. After 8 hours, the donor phase was removed from the surface of the cow's udder skin and rinsed several times with purified water. After removing external residue from the skin samples (0.64 cm²), the latter were extracted for 30 minutes with 1 ml of pure methanol using a Bandelin Sonorex Digitec ultrasonic bath (DT 156, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany). Later, the samples (PR-2 test) were analysed with gas chromatography and high-performance liquid chromatography (CHD-2 test) [206].

2.8. Methodology for the study of EF antimicrobial effect *in vitro* with reference cultures of microorganisms

The bactericidal and fungicidal activity of the produced optimal EF with different antimicrobial substances was evaluated by the dilution-neutralisation method according to standards EN 1656 and EN 1657 [207, 208]. In this study, the activity of teat dips against reference microorganisms was analysed: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Streptococcus uberis* ATCC 19436, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus niger* ATCC 16404. Test conditions: temperature 30±1 °C, exposure time 5 min, test concentrations of the product 80%, 50% and 10%, with the addition of the interfering substance skimmed milk 10 g/L. The logarithm was calculated according to the formula $\text{Log R} = \text{Log N}_o - \text{Log N}_a$. Pursuant to standards EN 1656 and EN 1657, the teat dip is considered to have bactericidal activity if the logarithm value obtained during the test exceeds 5, i.e. $\text{log R} > 5$, and to have fungicidal activity if the obtained logarithm value exceeds 4, i.e. $\text{log R} > 4$.

2.9. Methodology for the study of EF antimicrobial effect *in vitro* with clinical cultures of microorganisms

The test was carried out using a method based on the ability of the tested substance to diffuse in the nutrient medium [209]. Bacterial resistance to EF samples was evaluated in Mueller-Hinton agar (BBL, Cockeysville, USA) and Saburo agar (BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA) aseptic conditions using microorganisms isolated from clinical material. A suspension of microorganisms is produced from grown cultures in a physiological sodium chloride (0.9%) solution, standardised with McFarland's standard indicator ("Standart indikator McFarland", Biosan, Latvia), which measures the turbidity of the suspension in the test tube. A standardized (0.5 macF) suspension of microorganisms (20 mL) in agar gel was poured into sterile 90 mm diameter Petri dishes (F.L. Medical, Italy). Wells with an inner diameter of

7 mm were made in the solidified gel and filled with the test dye (0.1 mL). Petri dishes were incubated in a thermostat, and after 24 hours of incubation, the diameter of the clear zone was measured, the size of which determines the antimicrobial activity (linear dependence). The resistance of fungi and algae to teat dip EF was evaluated after 48 hours of incubation.

2.10. Analysis of statistical data

The obtained results were statistically processed using statistical data analysis packages: Microsoft Office Excel 2021 and IBM SPSS Statistics 29.0.0.0.

To ensure the reliability of the results, the test was repeated at least 3 times and the arithmetic mean and standard deviation were calculated. Differences were considered statistically significant where $p < 0.05$.

The compositions of the experimental teat dips were scored. The distributions of the evaluation scores were compiled, and the differences between the teat dips were assessed using the Chi-squared test. The averages of the evaluation scores were also calculated, and the variation was estimated by presenting the errors of the averages. Differences between teat dips were assessed by analysis of variance with Tukey's B host hoc test. The correlation coefficient was calculated according to Pearson's method. Differences were considered statistically significant where $p < 0.05$.

Mean values of pH, viscosity and iodine concentrations in the compared samples were calculated, and the variation was estimated by presenting the error of the mean. Differences between the teat dips in assessing changes over time were estimated by linear models with factors of time and dip. Differences between the teat dips at a fixed time and changes due to teat dip effect over time were assessed by Tukey's B host hoc test.

During the texture analysis, the texture averages were calculated in the compared samples, and the variation was estimated by presenting the error of the mean. Differences between teat dips were assessed by analysis of variance with Tukey's B host hoc test. Differences were considered statistically significant where $p < 0.05$.

3. RESEARTCH RESULTS

3.1. Development and production of experimental formulations of teat dips

After using the antimicrobial agent – lactic acid, three EFs with different concentrations of xanthan gum and dye CI 15985 were developed and produced for further *in vivo* studies, respectively: EF with lactic acid No 1

(PR-1) – 0.5% and 0.01%; EF with lactic acid No 2 (PR-2) – 0.67% and 0.03%; EF with lactic acid No 3 (PR-3) – 0.85% and 0.05%. EF had a uniform homogeneous appearance, an orange colour, a specific smell of lactic acid and a characteristic consistency.

After using the antimicrobial agent – povidone iodine, three EFs with different concentrations of xanthan gum, but without the use of added dye, were developed and produced for further *in vivo* studies. Concentration of xanthan gum in EF with povidone iodine No 1 (JP-1) – 0.5%, EF with povidone iodine No 2 (JP-2) – 0.67% and EF with povidone iodine No 3 (JP-3) – 0.85% respectively. EF had a uniform homogeneous appearance, brown colour, specific iodine smell and characteristic consistency.

After using the antimicrobial agent – chlorhexidine digluconate, three EFs with different concentrations of guar gum and dye CI 16255 were developed and produced for further *in vivo* studies, respectively: EF with chlorhexidine No 1 (CHD-1) – 0.5% and 0.02%; EF with chlorhexidine No 2 (CHD-2) – 0.89% and 0.05%; EF with chlorhexidine No 3 (CHD-3) – 1.2% and 0.12%. EF had a uniform homogeneous appearance, a red colour, a minty smell and a characteristic consistency.

At this stage, the task of creating EF was implemented by combining antimicrobial substances (lactic acid, chlorhexidine digluconate, iodine povidone) with natural thickeners, dyes and plant extracts.

3.2. Results of *in vivo* evaluation and selection of rheological properties of experimental compositions

During the study, the teat coating of the studied experimental compositions with a film and the uniformity of the coating, the formation of a barrier drop on the tip of the teat, visibility (evaluated colour) and economic value (by evaluating dripping after dipping) were evaluated.

During the *in vivo* evaluation of EF with lactic acid, it was found that two compositions PR-1 and PR-3 did not meet the requirements set for the product. The PR-2 formulation with 0.67% xanthan gum content in the product recorded non-intensive dripping after dipping, during the test it covers the dipped teat area with an even film, after a few minutes a stable hanging drop was formed, which does not fall down, and lasts for at least 60 minutes. The colourant CI 15985, which gives the product an orange colour, regardless of the amount in the experimental formulations, met the requirements, because the colour was clearly visible after dipping, and it lasted well for at least 60 minutes. The PR-2 formulation scored higher than PR-1 and PR-3 (Table 3.2.1).

During the *in vivo* evaluation of EF with povidone iodine, it was found that the experimental formulation JP-2 scored higher, the colour was clearly visible after dipping, and the colour was sustained the best of all the tested formulations with povidone iodine, because the teat coating was sufficiently uniform and has an even layer. A few minutes after dipping, a stable hanging drop was formed at the end of the teat, which does not fall down and lasts for at least 60 minutes.

EF CHD-2 collected a higher amount of points, covered the teat with a smooth film, after a few minutes a stable hanging drop was formed at the end of the teat, which lasted for at least 40 minutes. After dipping, the colour was clearly visible (red) and remained visible even after 60 min (Table 3.2.1).

Table 3.2.1. *EF in vivo* evaluation results by points according to *EF in vivo* evaluation methodology ($n = 25$)

Experimental compositions and evaluation results (mean score \pm error)									
Characteristic	PR-1	PR-2	PR-3	JP-1	JP-2	JP-3	CHD-1	CHD-2	CHD-3
Colour	4.0 \pm 0.09 c	4.0 \pm 0.08 c	3.8 \pm 0.11 c	2.2 \pm 0.07 a	4.1 \pm 0.09 c	4.0 \pm 0.04 c	2.8 \pm 0.07 b	4.9 \pm 0.06 d	4.9 \pm 0.07 d
Dripping immediately after dipping	2.0 \pm 0.12 b	3.8 \pm 0.11 d	2.8 \pm 0.07 c	2.2 \pm 0.07 b	4.1 \pm 0.07 d	2.8 \pm 0.08 c	1.1 \pm 0.06 a	3.0 \pm 0.06 c	1.9 \pm 0.07 b
Formation of a drop on the teat end	3.0 \pm 0.07 b	4.9 \pm 0.07 e	3.9 \pm 0.07 cd	2.9 \pm 0.11 b	4.9 \pm 0.06 e	3.8 \pm 0.13 c	1.2 \pm 0.09 a	4.1 \pm 0.07 d	2.8 \pm 0.07 b
Teat covered with a film	4.9 \pm 0.06 d	4.9 \pm 0.06 d	2.8 \pm 0.08 b	3.1 \pm 0.08 c	4.9 \pm 0.06 d	3.0 \pm 0.07 bc	3.2 \pm 0.07 c	4.9 \pm 0.07 d	2.1 \pm 0.08 a
Evenness of teat coverage	4.8 \pm 0.09 d	4.9 \pm 0.06 d	3.2 \pm 0.07 b	3.8 \pm 0.08 c	3.8 \pm 0.07 c	2.0 \pm 0.04 a	3.8 \pm 0.07 c	3.9 \pm 0.07 c	4.1 \pm 0.12 c
General evaluation of experimental compositions of the teat dip solution									
Total points	18.7	22.4	16.5	14.2	21.8	15.6	12.1	20.8	15.8
Xanthan gum	0.5%	0.67%	0.85%	0.5%	0.67%	0.85%	–	–	–
Guar gum	–	–	–	–	–	–	0.5%	0.89%	1.20%
Colorant	0.01%	0.03%	0.05%	–	–	–	0.02%	0.05%	0.12%

a, b, c, d, e – averages marked with different letters in the row are statistically significantly different from each other ($p < 0.05$, Tukey B test).

During the study, it was not found that the dye concentration could have a direct effect on the film coating of the teat, but it can be said that the dye concentration in EF PR-2 and CHD-2 had an effect on the visibility of the coating; however, the visibility was affected by the teat film coating and the uniformity of the film caused by the thickener concentrations.

During *in vivo* studies on farms, it was found that EF CHD-2 with chlorhexidine and guar gum 0.89% concentration, JP-2 with povidone iodine and xanthan gum 0.65% concentration, and PR-2 with lactic acid and xanthan gum 0.67% concentration most closely matched the requirements for the product being developed. According to the evaluation results presented in Table 3.2.1, the highest score (22.4 points) was obtained by the PR-2 formulation, which covered the skin of the teat more evenly and formed a drop at the end of the teat faster.

3.3. Results of EF physical properties and microbiological change during stability studies

3.3.1. Real-time stability programme results

The results of the real-time stability programme of the developed EFs with chlorhexidine digluconate, povidone iodine and lactic acid are presented in Table 3.3.1.1.

Table 3.3.1.1. Evaluation results of EF properties in real-time stability programme according Colipa guidelines “Guidelines on stability testing of cosmetic products” [203]

Evaluation period	Homogeneity	Colour	Odour	pH	Viscosity, mPa·s	Total aerobic microbial count, CFU/g (ml)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
PR-2							
After 24 h	Homogeneous	Orange	Characteristic lactic acid	2.70±0.10 A	936.67±5.77 a	< 1.0 × 10 ¹	Not found
After 6 months	Homogeneous	Orange	Characteristic lactic acid	2.67±0.12 A	903.33±5.77 b	< 1.0 × 10 ¹	Not found
After 12 months	Homogeneous	Orange	Characteristic lactic acid	2.73±0.06 A	866.67±5.77 c	< 1.0 × 10 ¹	Not found
After 24 months	Homogeneous	Orange	Characteristic lactic acid	2.60±0.00 A	826.67±5.77 d	< 1.0 × 10 ¹	Not found

Table 3.3.1.1. Continued

Evaluation period	Homogeneity	Colour	Odour	pH	Viscosity, mPa·s	Total aerobic microbial count, CFU/g (ml)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
JP-2							
After 24 h	Homogeneous	Brownish orange	Characteristic iodine	2.20±0.10 B	886.67±15.28 a	< 1.0 × 10 ¹	Not found
After 6 months	Homogeneous	Brownish orange	Characteristic iodine	2.20±0.10 B	856.67±5.77 b	< 1.0 × 10 ¹	Not found
After 12 months	Homogeneous	Brownish orange	Characteristic iodine	2.20±0.10 B	820.00±10.00 c	< 1.0 × 10 ¹	Not found
After 24 months	Homogeneous	Brownish orange	Characteristic iodine	2.20±0.10 B	786.67±20.82 c	< 1.0 × 10 ¹	Not found
CHD-2							
After 24 h	Homogeneous	Red	Characteristic mint essential oil	5.93±0.15 a C	1478.3±17.6 a	< 1.0 × 10 ¹	Not found
After 6 months	Homogeneous	Red	Characteristic mint essential oil	5.93±0.15 a C	1460.0±14.0 ab	< 1.0 × 10 ¹	Not found
After 12 months	Homogeneous	Red	Characteristic mint essential oil	5.93±0.15 a C	1435.0±15.0 bc	< 1.0 × 10 ¹	Not found
After 24 months	Not homogeneous, dark precipitate observed	Red	Characteristic mint essential oil	5.23±0.06 b C	1420.0±10.0 c	Not investigated	Not found

a, b, c, d – averages marked with different letters in the column (for each teat dip separately) differed statistically significantly ($p < 0.05$, Tukey B test); A, B, C – averages marked with different letters in the column (the teat dips compared at the same time of the study) differed statistically significantly ($p < 0.05$, Tukey B test); mean values and errors of the mean (mean ± error) of the studied characteristics have been presented.

When evaluating EF PR-2, no inconsistency of sensory properties with the set requirements was observed, during the observation period it remained homogeneous, bright orange in colour, had a typical lactic acid smell and did not become cloudy and no layering was observed in 6, 12 and 24 months after production. The pH value of EF PR-2 did not change statistically significantly over 12 months. After 24 months, the mean pH decreased slightly till 2.6 ($p > 0.05$). Correlation analysis revealed statistically significant linear relationships between pH in all EF series of this teat dip ($r = 0,97$).

It was found that the viscosity index of EF PR-2 decreases insignificantly ($p < 0.05$), after 6 months it is 3.4% lower than before production, after 12 months – 7.5% and after 24 months – 11.7% (Table 3.3.1.1).

After performing pH measurements of EF JP-2, it was found that the reading value remained unchanged throughout the observation period. In different JP-2 series, the viscosity readings was statistically significantly different ($p < 0.05$). On average, the viscosity reading in the real-time stability programme decreased from 886.67 to 786.67 mPa·s. After 24 months, viscosity decreases in all product series by 11.3%.

Sensory properties of EF CHD-2 samples did not change for 12 months. The consistency of the created composition was homogenous, even, the colour remained bright red, and the smell was stable – mint essential oil (Table 3.3.1.1). The results of the stability study showed that the pH values of EF CHD-2 were close between different batches and the product remained stable for 12 months. Differences in the developed teat dip data were found after 24 months, when the pH value decreased to 5.23 in all series ($p < 0.05$). During the period of further observation, this product changed visually and did not retain its physical properties.

EF CHD-2 viscosity readings decreased steadily during monitoring, statistically significant ($p < 0.05$) changes were found after six months. Viscosity of the product decreased by 2.6% and 3.9% after 12 and 24 months respectively. The Pearson correlation coefficient was determined between the viscosity parameters of different series – $r = 0.96–0.99$, the changes occurred evenly in all series.

The pH variation data presented in Fig. 3.3.1.1 show that the pH of the teat dips varies, and reliable differences within teat dips were found only in the CHD-2 teat dip.

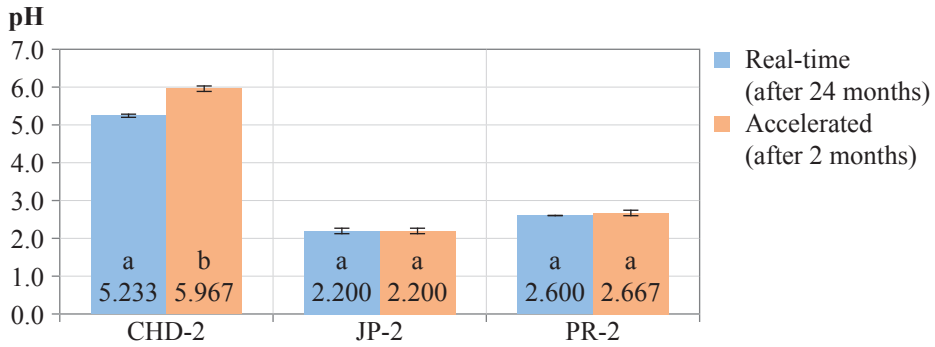


Fig. 3.3.1.1. Comparison of pH at the end of the stability study

a, b – means marked with different letters are statistically significantly different ($p < 0.05$, Student's test).

When measuring the viscosity and pH value of the created EFs, it was observed that these values remain closely related to each other. After performing the correlation analysis, it was determined (Fig. 3.3.1.2) that there are statistically significant linear strong relationships between viscosity and pH in all EF series (correlation coefficient $r = 0.986$ ($p < 0.001$)). The data presented in the Fig. 3.3.1.2 show that pH and viscosity are highly correlated, the higher the pH, the higher the viscosity ($p < 0.001$).

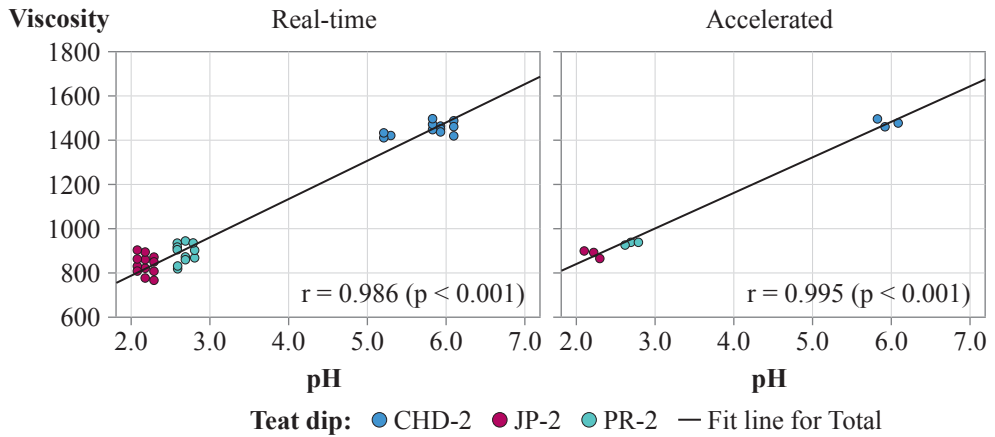


Fig. 3.3.1.2. Relationship between pH and viscosity (mPa·s)

Sterile conditions during production and the components with antimicrobial action contained in the created formulations resulted in no microbial growth detected in EF with iodine povidone, chlorhexidine digluconate and lactic acid. Total aerobic bacterial counts were $< 1.0 \times 10^1$ CFU/g (ml). Pathogens *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *C. albicans* were also not detected in 1 g of teat dip test material. The antimicrobial stability of EF samples with different compositions remained throughout the study period.

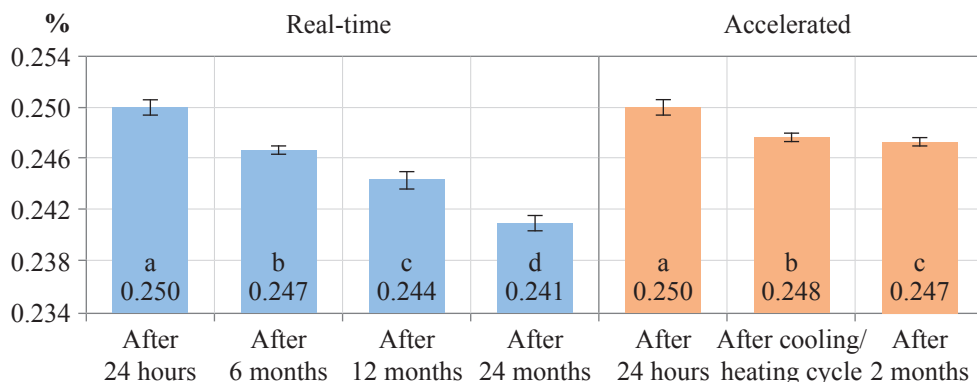


Fig. 3.3.1.3. Variation of the active iodine content (%) in the created EF JP-2 during real and accelerated stability

a, b, c, d – means marked with different letters are statistically significantly different ($p < 0.05$, Tukey B test).

In order to evaluate the release of iodine from the created EF, an iodine content test was performed in a real-time stability programme. The average iodine content after production was 0.25% (Fig. 3.3.1.3), and varied from 0.249% to 0.251% in different series.

A decreasing trend of iodine content was found during the intended periods of the *in vitro* study. On average, the amount of iodine in the samples after 6 months in the teat dip decreased by 1.2%, after 24 months – by 3.6% ($p < 0.05$).

3.3.2. Accelerated stability programme results

The colour, homogeneity, and odour of the produced EFs remained unchanged during the accelerated stability programme (Table 3.3.2.1). After the centrifugation tests the tested products did not change, they remained stable during the entire test and did not separate during the product phase.

Table 3.3.2.1. Evaluation results of EF properties in accelerated stability programme according Colipa guidelines “Guidelines on stability testing of cosmetic products” [203]

Evalua- tion period	Homo- geneity	Colour	Odour	pH	Viscosity, mPa·s	Total aro- bic micro- bial count, CFU/g (ml)	Centri- fuga- tion
PR-2							
After 24 h	Homo- genic	Orange	Characteristic lactic acid	2.70±0.06 A	936.7±4.08	< 1.0 × 10 ¹	Stable
Heating/ cooling cycles	Homo- genic	Orange	Characteristic lactic acid	2.70±0.00 A	*N/A	< 1.0 × 10 ¹	Stable
After 2 months	Homo- genic	Orange	Characteristic lactic acid	2.67±0.07 A	*N/A	< 1.0 × 10 ¹	Stable
JP-2							
After 24 h	Homo- genic	Brownish orange	Characteristic iodine	2.20±0.06 B	886.7±10.8 B	< 1.0 × 10 ¹	Stable
Heating/ cooling cycles	Homo- genic	Brownish orange	Characteristic iodine	2.20±0.06 B	*N/A	< 1.0 × 10 ¹	Stable
After 2 months	Homo- genic	Brownish orange	Characteristic iodine	2.20±0.06 B	*N/A	< 1.0 × 10 ¹	Stable
CHD-2							
After 24 h	Homo- genic	Red	Characteristic mint essential oil	5.93±0.09 C	1478.3±12.4 C	< 1.0 × 10 ¹	Stable
Heating/ cooling cycles	Homo- genic	Red	Characteristic mint essential oil	5.93±0.03 C	*N/A	< 1.0 × 10 ¹	Stable
After 2 months	Homo- genic	Red	Characteristic mint essential oil	5.97±0.07 C	*N/A	< 1.0 × 10 ¹	Stable

*N/A – not applicable. A, B, C – averages marked with different letters in the column (the test dips compared at the same time of the study) differed statistically significantly ($p < 0.05$, Tukey B test); mean values and errors of the mean (mean ± error) of the studied characteristics have been presented.

During storage of EF samples at higher temperatures, no deviation of the pH value from the initial value was observed (Table 3.3.2.1). It can also be stated that the change in pH value did not occur during cooling/heating periods in the samples and this value remained stable. From the data presented in the Table 3.3.2.1, it can be seen that the difficult experimental conditions do not have a statistically significant effect on the pH value ($p > 0.05$) – the pH value of all tested bleaches fluctuates within the stable limits characteristic of the product. This proves the stability of EFs.

During the accelerated stability study, it was found that the difficult experimental conditions do not significantly affect the physical and appearance characteristics of the created EFs. No growth of microorganisms was detected during the EF accelerated time stability programme. Total aerobic microorganisms counts were $< 1.0 \times 10^1$ CFU/g (ml). The antimicrobial stability of EF samples with different compositions remained throughout the 2-month study period.

Testing in the accelerated stability programme showed that the changed experimental conditions affect the iodine content. During cooling and heating cycles, EF iodine content decreased by an average of 0.8%. Storage of tested EF JP-2 for two months at a temperature of +45 °C caused a 1.2% decrease in iodine content ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.1.3).

3.4. Results of a texture analysis study

Tensile firmness and work of shear were evaluated by the spreadability test. Based on the results of the back extrusion test (Fig. 3.4.1), it was found that EFs with viscosity formulated with xanthan gum were characterised by higher hardness and consistency ($p < 0.05$). EF JP-2 has the highest hardness reading. A higher hardness reading indicates the strength of EF JP-2; this composition was harder and more resistant to mechanical effects. EF PR-2 samples were characterised by lower hardness, reliable statistical differences were found between them ($p < 0.05$). Analysing the hardness of EFs, we can say that the inclusion of xanthan gum influenced the parameter of the hardness index, because EF CHD-2 samples, where viscosity was formed with guar gum, were less hard ($p < 0.05$). The same trend was found when studying the consistency of EF samples. The consistency index describing the spreadability and thickness characteristics of the product was higher for EF formulated with xanthan gum. The thickest were the EF JP-2 samples (Fig. 3.4.1), and the viscosity of guar gum formulated in EF CHD-2, made the product less thick and with lower density.

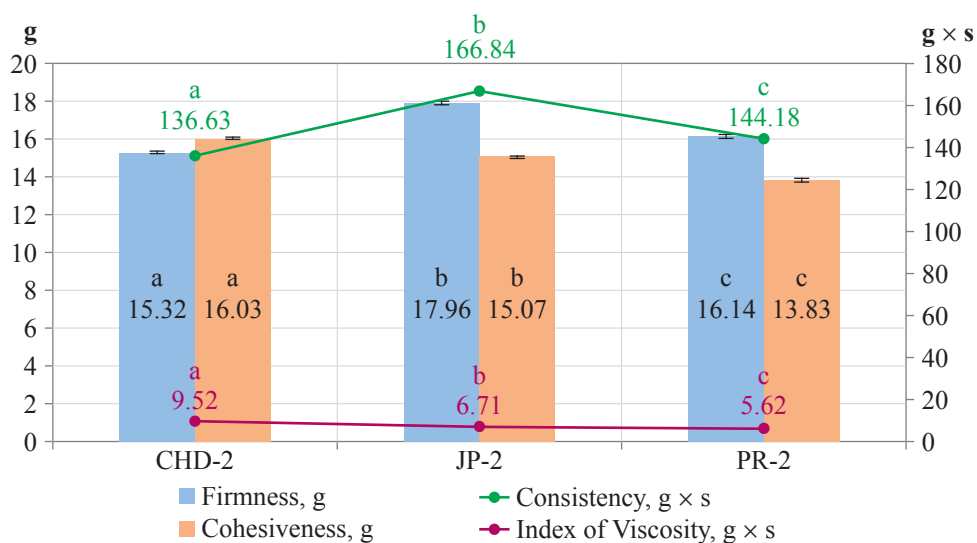


Fig. 3.4.1. Results of the back extrusion test ($n = 3$)

a, b, c – averages marked with different letters (between CHD-2, JP-2, PR-2 teat dips) differ statistically significantly ($p < 0.05$).

Among all tested EFs, EF CHD-2 samples had the highest viscosity index. The mechanical work required to remove the probe from the EF CHD-2 sample was on average 9.52 ± 0.25 g × s (Fig. 3.4.1). This mechanical work was lower for other tested EFs ($p < 0.05$). The higher viscosity index of the CHD-2 samples showed EF's stickiness and ability to remain at the place of use, the sample will run off less from the surface of the teat, a film of sufficient thickness will be formed, and greater force will be needed to break the integrity. The lowest viscosity index was found in EF PR-2 samples, therefore, out of all the tested samples, PR-2 should remain the shortest at the place of use (Fig. 3.4.1).

The highest value of cohesiveness, where the reading was obtained by withdrawing the probe from the deep layers of the sample, was determined in the CHD-2 samples (Fig. 3.4.1). The CHD-2 cohesiveness strength reading showed that in this EF, the product particles adhere best to each other compared to other tested EFs, after being spread on the surface, the sample stays longer at the site of exposure and forms a film of suitable thickness. The cohesiveness index describes the stickiness, so it is very important for teat dips. The study data allow to predict that the developed EF CHD-2 is best suited to stay on the teat. Guar gum gives EF CHD-2 a more sticky and optimal film thickness, which was lower in EF with xanthan gum JP-2 and PR-2, although statistically insignificant ($p < 0.05$).

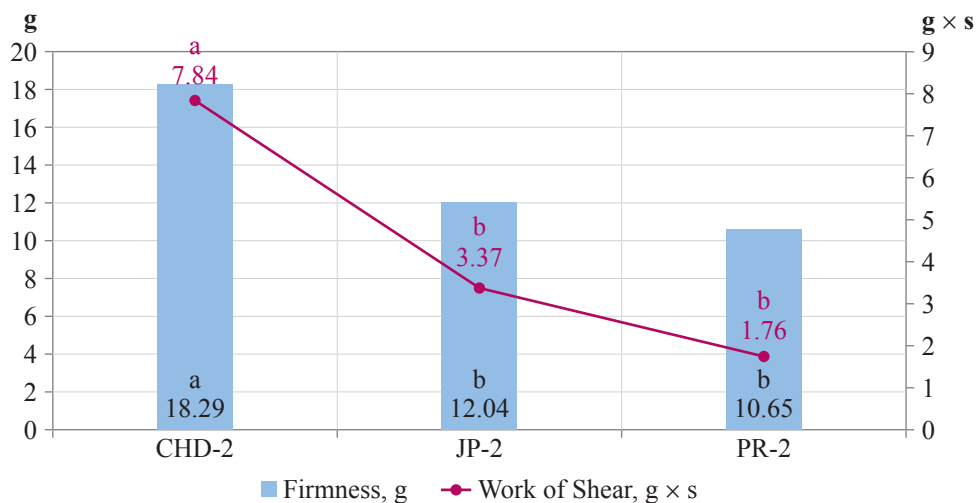


Fig. 3.4.2. Data of the texture analysis of the tested teat dips after the spreadability test ($n = 3$)

a, b – averages marked with different letters (between CHD-2, JP-2, PR-2 teat dips) differ statistically significantly ($p < 0.05$)

The spreadability test was performed to determine the values of hardness and shear force, which evaluate the distribution of the samples on the surfaces. The maximum hardness and shear strength of the samples was determined in EF CHD-2 ($p < 0.05$) (Fig. 3.4.2). The results obtained in the study show that within the EF CHD-2 samples, the adhesion forces increase the most, the interaction of molecules increases, as a result of which CHD-2 will remain longer at the site of exposure. EF samples with xanthan gum showed statistically significantly ($p < 0.05$) lower hardness and shear force characteristics. Based on the results of the study, it can be said that PR-2 and JP-2 will remain at the site of exposure for a shorter time than CHD-2 samples (Fig. 3.4.2).

Guar gum affected the textural properties of EF as sample hardness-toughness (1.7–1.5 times), work of shear (4.4–2.3 times), cohesiveness (1.06–1.15 times) and viscosities index (1.6–1.4 times) was higher compared to EF made with xanthan gum.

3.5. Results of *ex vivo* into skin penetration of antimicrobial substances testing

The PR-2 and CHD-2 formulations of teat dip were chosen to evaluate the penetration into cow udder tissues, and the methanolic (CH₃OH) solutions of analysed antiseptics (5.04% lactic acid and 2.5% chlorhexidine digluconate) were used for control.

After conducting studies using gas chromatography with mass spectrometry following derivatization of methanolic samples, we found that lactic acid penetrates through the stratum corneum of the skin. During the study, after 8 hours, lactic acid was quantitatively determined in the skin of the teats. It was found that $9.86 \pm 0.257\%$ of lactic acid from teat dip PR-2 samples penetrated into the skin of cows' udders. (flows were determined – $3.96 \pm 0.088 \text{ mg/cm}^2$). In different samples, the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). The penetration of all samples was statistically significantly lower ($p < 0.05$) compared to the 5.04% control methanolic solution of lactic acid, the skin penetration of which was determined to be $15.73 \pm 4.635\%$ (flows were determined – $6.22 \pm 1.832 \text{ mg/cm}^2$) ($p < 0.05$). The results of lactic acid penetration from teat dip PR-2 are presented in Fig. 3.5.1.

The amount of lactic acid detected in the udder skin of cows when teat dip PR-2 was applied to the animal tissue was statistically significantly ($p < 0.05$) 1.6 times lower than that found after the control solution of lactic acid in methanol was applied to the tissue. The stratum corneum of the skin formed a partial barrier to the penetration of the components of the teat dip.

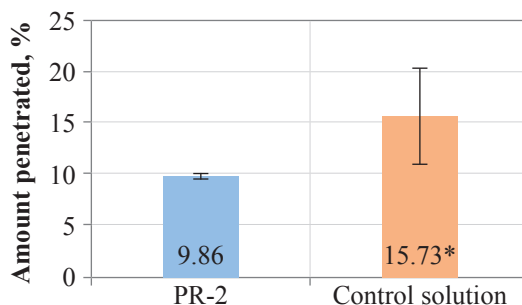


Fig. 3.5.1. Examination of *ex vivo* samples of lactic acid penetration contained in PR-2 dip, % (* $p < 0.05$)

The influence of the skin barrier on the CHD penetration from the dip formulation CHD-2 was evaluated. The study showed that CHD from the EF did not penetrate the skin or the penetration was below the detection limit in the study after five minutes of experimental contact (Fig. 3.5.2). It can be stated that skin exposure of CHD is not identifiable because the concentration

of CHD was below the quantification limit of the ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method.

After conducting penetration tests with CHD-2 teat dip samples, the results allow to conclude that chlorhexidine does not penetrate the animal skin samples and remains completely on the skin surface. After applying *ex vivo* study methodology and UPLC, after 5 min chromatograms did not detect chlorhexidine in any of the skin samples tested (Fig. 3.5.2).

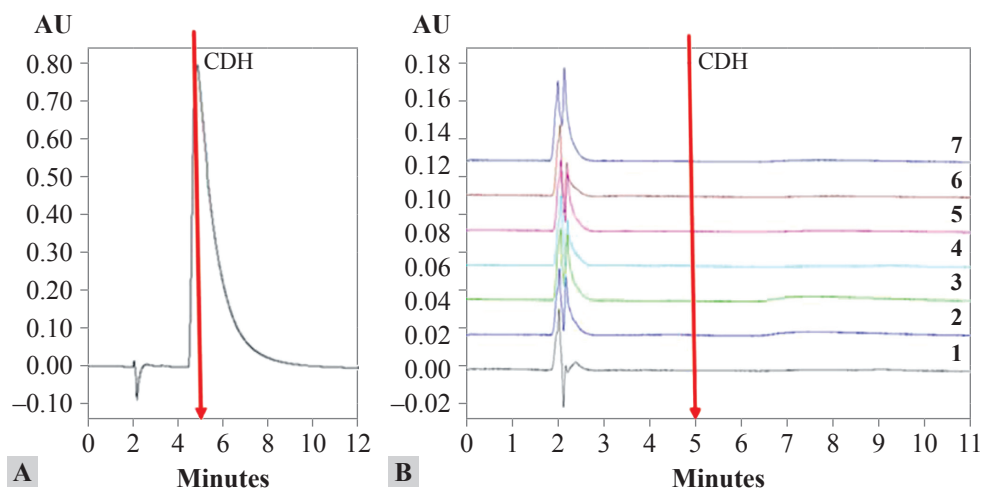


Fig. 3.5.2. CHD UESC chromatograms (control - penetration after 5 min)

A – control (CHD retention time 5 min); B – chromatogram of permeation of chlorhexidine from skin samples (where skin samples 1–7).

In the presented chromatograms (Fig. 3.5.2), penetration of CHD into the skin of the teat has not been established. The release of an antiseptic substance from an emulsion dosage form depends on the solubility of the substance molecules and on the viscosity of the modelled teat dip. The viscosity provided by guar gum was twice that of xanthan gum (the higher the viscosity, the slower the drug release due to the slow diffusion process of the molecules). Polysorbate is noted as a penetration enhancer, but in this case, its effect was not significant.

3.6. Results of the *in vitro* antimicrobial effect of EF with reference cultures of microorganisms

When studying the compositions of the developed experimental test dip formulations with lactic acid, iodine povidone and chlorhexidine according to international standards, it was found that EF were bactericidally and fungicidally active, when analysing the effectiveness against microorganisms, $\log R > 5$ was obtained for bacteria and $\log R > 4$ for fungi (Tables 3.6.1–3.6.3). The study was conducted with 80, 50 and 10% EF solutions.

Table 3.6.1. EF PR-2 (80%, 50%, 10%) antimicrobial efficiency ($\log R$) according to UNI EN 1656 and UNI EN 1657 standards

Test micro-organisms	Test suspension	Results PR-2		
		80%	50%	10%
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 46–35* N: 4.05 × 10 ⁸ No: 4.05 × 10 ⁷ log No: 7.61	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.09 Not active	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.09 Not active	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.09 Not active
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 42–30* N: 3.60 × 10 ⁸ No: 3.60 × 10 ⁷ log No: 7.56	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.41 Active	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.41 Active	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.04 Not active
<i>E. coli</i> ATCC 10536	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 44–49* N: 4.65 × 10 ⁸ No: 4.65 × 10 ⁷ log No: 7.67	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R < 5.52 Active	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na = 2.15 log R = 5.52 Active	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.15 Not active
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10 ⁻⁵ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁶ : 49–46* N: 4.75 × 10 ⁷ No: 4.75 × 10 ⁶ log No: 6.68	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 3.16 Not active	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 3.16 Not active	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 3.16 Not active
<i>A. niger</i> ATCC 16404	10 ⁻⁵ : > 165 –> 165* 10 ⁻⁶ : 22–20* N: 2.10 × 10 ⁷ No: 2.10 × 10 ⁶ log No: 6.32	Vc: > 165 –> 165 Na < 140 log Na > 3.22 log R < 3.1 Not active	Vc: > 165 –> 165 Na < 1650 log Na > 3.22 log R < 3.1 Not active	Vc: > 165 –> 165 Na > 1650 log Na > 3.22 log R < 3.1 Not active

No = number of CFU/mL in the test mixture; R = reduction in viability; Na = number of CFU/mL of the test mixture; Vc = viable count; N = number of CFU/mL of the test suspension; * number of colonies (CFU) in test suspension dilutions.

Table 3.6.2. JP-2 antimicrobial efficiency according to UNI EN 1656 and UNI EN 1657

Test micro-organisms	Test suspension	Results JP-2		
		80%	50%	10%
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 39–42* N: 4.05 × 10 ⁸ No: 4.05 × 10 ⁷ log No: 7.61	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.46 Active	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.46 Active	Vc: 189– 171 Na = 1800 log Na = 3.26 log R = 4.35 Not active
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	10 ⁻⁶ : >330 –>330* 10 ⁻⁷ : 38–48* N: 4.30 × 10 ⁸ No: 4.30 × 10 ⁷ log No: 7.63	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.48 Active	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.48 Active	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.11 Not active
<i>E. coli</i> ATCC 10536	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 42–46* N: 4.40 × 10 ⁸ No: 4.40 × 10 ⁷ log No: 7.67	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.49 Active	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.49 Active	Vc: 18 –< 14 Na < 160 log Na < 2.2 log R > 5.44 Active
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10 ⁻⁵ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁶ : 38–44* N: 4.10 × 10 ⁷ No: 4.10 × 10 ⁶ log No: 6.61	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 4.46 Active	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 4.46 Active	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 3.09 Not active
<i>A. niger</i> ATCC 16404	10 ⁻⁵ : > 165 –> 165* 10 ⁻⁶ : 28–32* N: 3.00 × 10 ⁷ No: 3.00 × 10 ⁸ log No: 6.48	Vc: > 165 –> 165 Na > 1650 log Na > 3.22 log R < 3.26 Not active	Vc: > 165 –> 165 Na > 1650 log Na > 3.22 log R < 3.26 Not active	Vc: > 165 –> 165 Na > 1650 log Na > 3.22 log R < 3.26 Not active

No = number of CFU/mL in the test mixture; R = reduction in viability; Na = number of CFU/mL of the test mixture; Vc = viable count; N = number of CFU/mL of the test suspension; * number of colonies (CFU) in test suspension dilutions.

Table 3.6.3. EF CHD-2 antimicrobial efficiency according to UNI EN 1656 and UNI EN 1657

Test micro-organisms	Test suspension	Results CHD-2		
		80%	50%	10%
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 39–42* N: 4.05 × 10 ⁸ No: 4.05 × 10 ⁷ log No: 7.61	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.46 Active	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.46 Active	Vc: 189– 171 Na = 1800 log Na = 3.26 log R = 4.35 Not active
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	10 ⁻⁶ : > 330 –> 330* 10 ⁻⁷ : 38–48* N: 4.30 × 10 ⁸ No: 4.30 × 10 ⁷ log No: 7.63	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.48 Active	Vc: < 14 –< 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.48 Active	Vc: > 330 –> 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.11 Not active

Table 3.6.3. Continued

Test micro-organisms	Test suspension	Results CHD-2		
		80%	50%	10%
<i>E. coli</i> ATCC 10536	10 ⁻⁶ : > 330 → 330* 10 ⁻⁷ : 42–46* N: 4.40 × 10 ⁸ No: 4.40 × 10 ⁷ log No: 7.67	Vc: < 14 – < 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.49 Active	Vc: < 14 – < 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.49 Active	Vc: 18 – < 14 Na < 160 log Na < 2.2 log R > 5.44 Active
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10 ⁻⁵ : > 330 → 330* 10 ⁻⁶ : 38–44* N: 4.10 × 10 ⁷ No: 4.10 × 10 ⁶ log No: 6.61	Vc: < 14 – < 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 4.46 Active	Vc: < 14 – < 14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 4.46 Active	Vc: > 330 → 330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 3.09 Not active
<i>A. niger</i> ATCC 16404	10 ⁻⁵ : > 165 → 165* 10 ⁻⁶ : 28–32* N: 3.00 × 10 ⁷ No: 3.00 × 10 ⁸ log No: 6.48	Vc: > 165 → 165 Na > 1650 log Na > 3.22 log R < 3.26 Not active	Vc: > 165 → 165 Na > 1650 log Na > 3.22 log R < 3.26 Not active	Vc: > 165 → 165 Na > 1650 log Na > 3.22 log R < 3.26 Not active

No = number of CFU/mL in the test mixture; R = reduction in viability; Na = number of CFU/mL of the test mixture; Vc = viable count; N = number of CFU/mL of the test suspension; * number of colonies (CFU) in test suspension dilutions.

The highest antimicrobial activity was observed in EF JP-2, which contains 2.36% povidone-iodine (active iodine content 2,500 ppm). In the presence of 10% concentration, the teat dip inhibited the growth of *S. aureus*, *E. coli* and *S. uberis* reference cultures. At 80% and 50% concentration of EF CHD-2 solution, it inhibited the growth of the tested bacteria well, but 10% teat dip solution was only effective against *E. coli*. PR-2 80 and 50% EF solutions were antimicrobially active against *E. coli* and *S. uberis* reference strains (log R = 5,52 and log R > 5,41).

The developed EF JP-2 inhibited the growth of the reference strains *C. albicans*. Meanwhile, EF PR-2 did not show activity to this reference strain, as did 10% EF CHD-2 solution. EFs containing lactic acid inhibited bacterial growth less than EFs containing iodine or chlorhexidine. None of the generated EFs inhibited the growth of the reference *A. niger* strains, regardless of the antiseptic agent contained in the EF. The obtained results are presented in Tables 3.6.1–3.6.3.

3.7. Results of *in vitro* antimicrobial activity of EF with clinical cultures of microorganisms

After comparing the antimicrobial activity data of tested EF *in vitro*, it was found that EF had different activity against the tested microorganisms, where most active EF inhibition was exerted on *S. aureus* (20.27±3.29 mm)

and CoNS strains (23.90±3.16 mm) and less effective against Gram-negative bacteria (15.24±2.94 mm, $p < 0.05$) (Fig. 3.7.1).

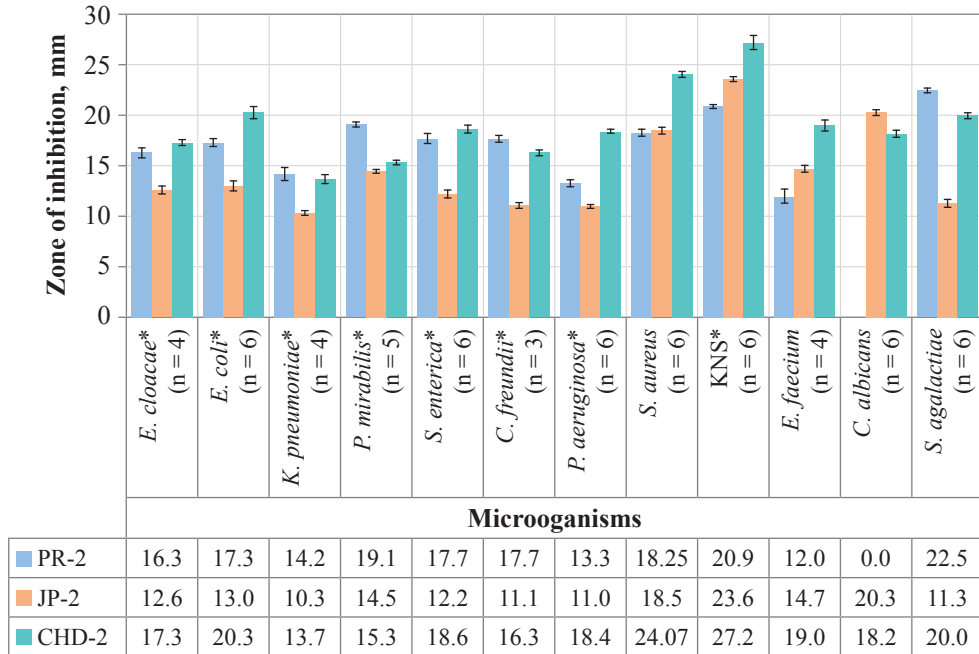


Fig. 3.7.1. Dynamics of growth inhibition zones of microorganisms ($n = 62$) isolated from the animal environment after being exposed to the created teat dips, * $p < 0.05$

* – statistically significant differences between microorganism species ($p < 0.05$).

When evaluating the EF test results, it was found that the tested EF, which is active against one microorganism, will not necessarily be active against another. EF CHD-2 was the most active against all bacteria used in the study: its activity was statistically significantly stronger ($p < 0.05$) against Gram-negative bacteria (17.12±2.22 mm clear zone) and against Gram-positive bacteria (22.57±3.78 mm). EF with chlorhexidine inhibited the growth of Gram-negative bacteria (*E. cloacae*, *P. mirabilis*, *S. enterica*, *C. freundii*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*) better ($p < 0.05$) than EF with iodine (clear zone mean 12.40±1.3 mm, $p < 0.05$). However, its activity against *P. mirabilis* and *K. pneumoniae* (clear zone mean 14.50±1.13 mm, $p < 0.05$) was lower than that of EF PR-2 (16.65±3.47 mm respectively). In Petri dishes with EF PR-2, it was found that it was more effective against Gram-negative (16.51±2.08 mm) and against Gram-positive (18.41±4.62 mm) bacteria than EF with povidone iodine (respectively 12.10±1.43 mm and 17.02±5.28 mm, $p < 0.05$).

During the study, EF JP-2 was more effective against the yeast *C. albicans* than other tested experimental formulations (20.30±0.28 mm, $p < 0.05$).

After evaluating the activity against *E. faecium*, it was found that the tested EFs did not show pronounced efficiency against this microorganism. EF CHD-2 was more effective (19.00±0.54 mm, $p < 0.05$) (Fig. 3.7.1). After evaluating the activity against *S. aureus*, it was found that all developed EFs were characterised by activity against this microorganism (the average of clear zones – 18.25–24.07 mm, $p < 0.05$). EF CHD-2 (20.30±0.56 mm) and EF PR-2 (17.30±0.34 mm, $p < 0.05$) are the most active against *E. coli*. All tested EFs were active against KNS, with the widest inhibition zones were determined – 20.9–27.2 mm ($p < 0.05$). The data presented in Fig. 3.7.1 suggest that the most effective EF is CHD-2, which exhibited strong antibacterial and growth-inhibiting properties of the yeast *C. albicans*.

After evaluating the activity of the tested EFs against the *P. zopfii* culture, it was found that the EFs exhibited different properties against this microorganism. EF JP-2 reliably inhibited the growth of *P. zopfii* for two days. In the effect of EF JP-2, the average zone of inhibition determined was 31.4±0.9 mm ($p < 0.05$), scarce algal growth was visible only in half of the Petri dishes. Continuing the incubation in the thermostat for another five days, a non-intensive growth of the algae *P. zopfii* was found in the dishes, the diameter of the clear zone decreased to 26.2±0.8 mm. The data presented in Fig. 3.7.2 suggest that EF JP-2 exhibited strong growth inhibitory properties of *P. zopfii* in an *in vitro* study, its performance is reliably ($p < 0.05$) more effective than other tested EFs. Against *P. zopfii* EF CHD-2 efficiency (Fig. 3.7.2) was significantly lower ($p < 0.05$), the clear zone was – 19.1±0.6 mm. EF PR-2 has not been found to affect the algae *P. zopfii*.

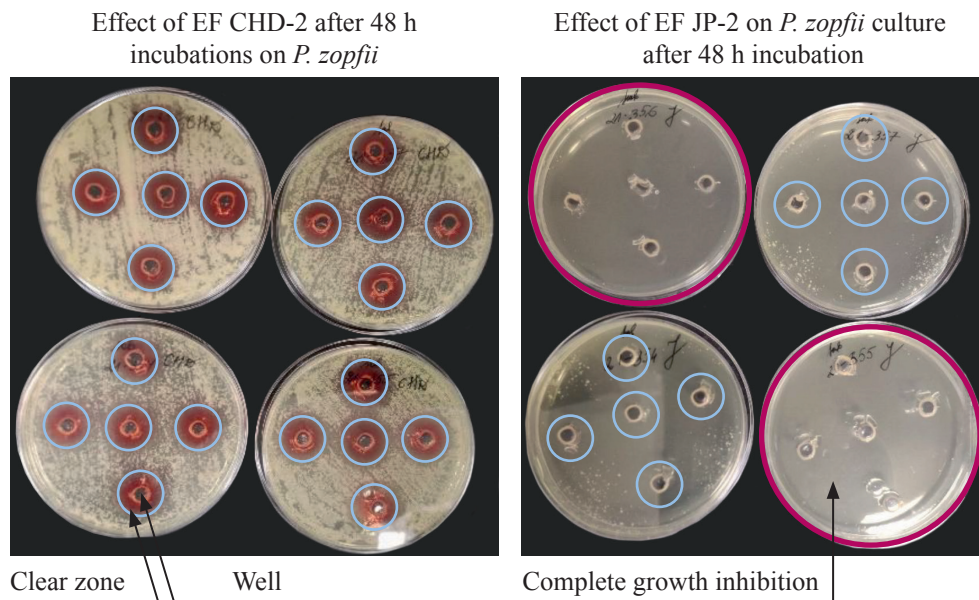


Fig. 3.7.2. Visualization of the effect of EF after 48 h of incubation on *P. zopfii* strains (visible diameter of the clear zone formed around the wells) (author's photos)

3.8. Comparison of the properties of the created teat dips

The modelled teat dips of a new formulation had a uniform homogeneous appearance, the required viscosity, and perfectly covered the skin of the teat. It had orange, brown and red colours, which allow to control the performance of post-milking antiseptic. In addition, it is characterised by the specific odour of embedded plant extracts or antiseptic substances. The similarities, differences and application of the modelled dips are presented in Table 3.8.1.

Table 3.8.1. Comparison of the properties of the created EF teat dips

Experimental formulations		JP-2	PR-2	CHD-2
Udder hygiene after milking				
Application	Teat antiseptic	Antimicrobial effect		
	Teat skin care	Moisturises and softens the skin of the teats		
	Closure of the teat duct	Forms a protective barrier		
	Protection against mastitis	Preventive measure		
Composition	Active substance	Povidone iodine	L-(+)-lactic acid	Chlorhexidine digluconate
	Active substances concentration in EF	2,500 ppm (available iodine)	6.3 %	5,000 ppm
	Stabiliser	Xanthan gum	Xanthan gum	Guar gum
	Skin softener, moisturiser	Glycerine, sorbitol	Glycerine, sorbitol	Glycerine
	Herbal components	Calendula officinalis dry extract	Chamomilla flower dry and Avena sativa dry extracts	Mentha Arvensis Herb Oil, Aesculus hippocastanum dry extract
Properties	Colour	Orange brown	Orange	Red
	Smell	Iodine	Lactic acid	Mint essential oil
	Viscosity	850–900 mPa·s	900–950 mPa·s	1450–1500 mPa·s
	pH	2.1–2.3	2.6–2.8	5.8–6.1
Comparison of texture properties with each other				
Firmness (Hardness)	Hardest EF, the most resistant to mechanical effects	Harder EF, resistant to mechanical effects	Softest EC, less resistant to mechanical effects	
Consistency	Thickest, highest density	Thick, higher density	Lowest density	
Index of Viscosity	Low viscosity index will remain at the application site for a short time	Lowest viscosity index will remain at the application site for a shortest time	Highest the viscosity index will remain the longest at the application site	
Cohesiveness	The product particles adhere well to each other, the sample remains in the place of exposure for a long time, and forms a film of suitable thickness	The lowest value of cohesiveness, the product particles adhere to each other the weakest, the sample spread on the surface remains the shortest	The highest value of cohesiveness. The best adhesion of product particles to each other, the sample remains longer at the place of exposure, forms a film of suitable thickness	

Table 3.8.1. Continued

Experimental formulations	JP-2	PR-2	CHD-2
Comparison of texture properties with each other			
Firmness (Hardness) and Work of Shear	Hardness and work of shear inside the samples, lower than CH EF, molecular interaction is lower, it will remain at the exposure site for a shorter time	The hardness and work of shear inside the samples are the lowest, less interaction between the molecules, they will remain at the exposure site shorter	The highest sample hardness and work of shear, the adhesion forces increase the most inside the samples, the interaction of molecules increases, as a result of which CHD-2 will remain longer at the site of exposure
EF antimicrobial effect <i>in vitro</i> with tested reference cultures (80%)			
Antimicrobial effect	Active (log R > 5)	Active (log R > 5), except <i>S. aureus</i>	Active (log R > 5)
Effect against <i>C. albicans</i>	Active (log R > 4)	Not active (log R < 4)	Active (log R > 4)
Effect against <i>A. niger</i>	Not active (log R < 4)	Not active (log R < 4)	Not active (log R < 4)
EF antimicrobial effect <i>in vitro</i> with tested clinical cultures			
Antimicrobial effect	Active	Active	Active
Effect against <i>C. albicans</i>	Active	Not active	Active
Effect against <i>P. zopfii</i>	Active	Not active	Active

The developed teat dips are intended for the prevention of mastitis. All three were antimicrobially active against the tested reference bacteria and bacteria isolated from the cow's environment. JP-2 and CHD-2 showed stronger antimicrobial activity. The most effective action against *P. zopfii* was determined for JP-2 teat dip. Due to the formed sufficient viscosity of xanthan (850–950 mPa·s) and guar (1450–1500 mPa·s) gum, the new dips evenly covered the teats, held on for the required time, and formed a protective barrier. In addition, the ingredients glycerol, sorbitol and herbal medicinal substance additives moisturise, soften and protect the skin of the teats. Different components formed the textural properties of bleaches, such as stickiness, adhesion, thickness and hardness. The thickest, hardest and most resistant to mechanical effects are JP-2 and PR-2 new dips containing xanthan gum. CHD-2 dip containing guar gum was the most sticky and viscous.

4. DISCUSSION

For the prevention of mastitis in cows, the reduction of somatic cells and the total number of bacteria in raw milk, as well as the use of post-milking teat dips is important. The teat ducts are protected from the entry of microorganisms by using the teat dips. The development, testing, and application of new post-milking teat dips is the fulfilment of the expectations and needs of animal husbandry specialists, which is a continuous challenge for science.

Newly developed teat dips contain components such as a thickener, an antimicrobial active ingredient, moisturising and teat skin-protecting ingredients and auxiliary substances with a technological role. The greatest attention was paid to the most important parameters of teat dips, i.e. antimicrobial effectiveness and rheological properties, so that the antiseptic substance maintains proper contact with the skin of the teat without dripping off. Antiseptic material is one of the most important components of teat dips. In the dissertation, when developing teat dip prototypes, antimicrobial substances were selected in accordance with Lithuanian legislation [93] and European Union regulation [5] and recommendations of raw material manufacturers [212], as they are intended for the production of veterinary products, including post-milking teat dips.

The use of different active substances in teat dips ensures a wide spectrum of disinfection, in addition, the developed product must be harmless to the animal and the environment [7, 8]. The choice of lactic acid in the teat dip PR-2 was determined by the fact that it is widely used in the field of veterinary medicine, is characterised as being active against Gram-positive and Gram-negative bacteria, not a toxic or dangerous substance, and does not cause allergic skin reactions or irritation. A study by Fitzpatrick et al. [54] indicates that teat dipping solutions with lactic acid protect the teat canal from potential infections or inflammation, and the resulting film is effective until the first wash. PR-2 dip covered the teat skin with an even film and with a smooth layer, the remains of the formed film were visible even after 12 hours, while the *in vitro* studies showed the antimicrobial effectiveness of the PR-2 dip.

Another antiseptic agent chosen in JP-2 is povidone-iodine, as iodine and its compounds are also widely used in veterinary medicine. One of the most widespread uses is the antiseptic of cow udders before and after the milking process. It is indicated that in iodine-based dips, the optimal concentration of the active substance is 0.5–1.0% [213, 214]. Comparing the effectiveness of teat dips with different concentrations of iodine (1%, 0.25% and 0.1%), the study found no significant difference in the occurrence of new cases of mastitis in the different groups, and that the concentration of the active ingredient in the dip did not correlate with antimicrobial effectiveness [215].

The modelled JP-2 dip containing only 0.25% of the active substance, as shown by *in vitro* studies, was effective against reference and clinical strains of microorganisms and, at the same time, economical and cost-efficient.

Iodine can cause teat skin irritation, so skin-friendly components are necessary in teat dips. For this purpose, glycerol, sorbitol and medicinal chamomile extract were used, which also gave it a distinctiveness against other bleaches on the market. It should be noted that teat dips with iodine have an advantage – iodine provides a bright brown colour that makes the antiseptic easily visible on the skin. In addition, the povidone-iodine complex used in the dip ensures the stability of iodine and the maintenance of maximum antiseptic properties in the product, which was confirmed by the available iodine quantity tests during stability programmes and *in vitro* antimicrobial properties tests. EF JP-2 (2.36% povidone-iodine) formed a stable, high-quality barrier film, which, as indicated in the works of other researchers [115], is important in reducing the number of clinical and subclinical mastitis cases in the herd.

Chlorhexidine digluconate was selected as an antiseptic agent for udder skin hygiene after milking in teat dip CHD-2. The choice of this antiseptic was determined by the fact that chlorhexidine does not enter products of animal origin, it does not have a withdrawal period, in addition, chlorhexidine can be used as an antiseptic for teat skin and for the treatment of lesions. Chlorhexidine has a broad antimicrobial effect and does not irritate the skin. It is a strong agent affecting the bacterial membrane, inhibiting the growth of bacterial spores. It has high activity against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* [81, 219]. The conducted studies with EF CHD-2 confirmed these statements, as a relatively small (0.5%) CHD concentration used, without the addition of other antimicrobial agents, showed pronounced antimicrobial efficacy against most of the tested reference and clinical strains of microorganisms.

In addition to the antiseptic effect, viscosity of the teat dip is important, i.e. rheological parameter of teat dip that reflects product quality [11, 85]. Therefore, in our study, we focused a lot attention on obtaining the viscosity. Product quality, stability and cost-effectiveness are always important when modelling formulation recipes. After determining the desired viscosity of the experimental formulation, selecting dyes and plant components, an *in vivo* study was conducted, which allowed the selection of technologically optimal and economical compositions of created teat dips. After conducting an *in vivo* study with experimental teat dip formulations, the formulations that met the set requirements the best, which formed a solid and highly visible protective film on the teat, adequately covered the teat skin, lasted for the specified time, and properly coated the teat skin with the colour required for the control. This study determined the concentration of thickener needed to produce a viscous

solution within the parameters that would form a stable film on the surface of the teat, so that when applied to the cow's udder, a hanging drop would form which would dry over time and form a durable barrier protecting the teat canal against microorganisms.

The viscosity of teat dips is regulated by different types of thickeners, and selecting natural, semi-synthetic or synthetic polymers, which have different physicochemical properties [10]. When creating the teat dips, we chose thickeners of natural origin, which, when dissolved in water, formed a dense network of hydrophilic polymers, resulting in solutions with sufficient viscosity. The thickeners used in the *in vivo* study showed good film-forming properties (forming a physical barrier), which is especially important in the formulation of veterinary teat protection products. In addition, guar and xanthan gum do not pose a risk to human health or the environment, and according to the Regulation (EC) No 1272/2008 are not classified [87].

When creating experimental formulations with lactic acid and povidone iodine, xanthan gum was chosen, and guar gum was chosen for the teat dip with chlorhexidine, due to the manufacturer's practical recommendations and better compatibility with the antimicrobial substance [212]. The specification for xanthan gum has a wide concentration range of 0.5–2.5%. The required viscosity concentration range was tested *in vivo* and found to be a sufficient concentration of 0.67%. According to the researchers, xanthan gum is soluble in high and low temperature water. Solutions of this polymer have the unique property of maintaining stable viscosity parameters with increasing temperature [132].

Guar gum not only acts as a thickener, but also forms a protective film, has an emulsifying effect and stabilises the product during development [85]. The amount of guar gum used in the products ranges from 0.1 to 0.3% [222]. We used hydroxypropyl guar polymer $C_3H_8O_2 \times$ (isomer), which is a purified nonionic derivative of guar gum. It acts as an excellent thickener in cosmetics and also acts as an O/W emulsion stabiliser, and is particularly useful in stabilising emulsions containing alcohol [212]. In the study, 0.89% of hydroxypropyl guar gum was sufficient in the modelled teat dip. This thickener concentration maintained the physical properties of the modelled product within stable limits, i. e. monitoring 1 year after manufacture.

Kumar et al. [194] indicated that the selection of excipients is important in the development of products for use on the skin. Each ingredient has its own function in the product. With proper selection of excipients, stable systems can be effectively formed. Isopropanol and polysorbate 20 were selected as process materials that mix well with other ingredients when creating teat dip formulations. This property of isopropyl alcohol allows it to be used to dissolve many organic compounds, it is often used as a solvent in pharmaceu-

tics and cosmetics [170, 171]. This alcohol is also used as an antiseptic because it prevents the reproduction of microorganisms [223].

Glycerol and sorbitol were chosen as emollients, because these substances intensively moisturise and soften the skin of the teats, protect against adverse environmental conditions, and restore the barrier function of the skin. These substances are especially often found in veterinary products that are intended for use on the surface of the skin. Glycerol moisturises the horny layer of skin, increases elasticity, protects against external irritants, and improves wound healing. Some data state that glycerol can also have an antimicrobial effect [137]. Dyes are intended to leave evidence of post-milking hygiene. The selection of dyes used in the cosmetics and food industry in the modelling of teat dip EF PR-2 and CHD-2 proved successful, as they provided a bright and stable colour, were in combination with other ingredients, and did not crystallise.

Plant extracts were used in the modelling of teat dips due to their sensory properties, antioxidant and antimicrobial activity, and specific beneficial biologically active substances present in them. Plant extracts and their active substances are included in the formulations of pharmaceutical forms due to their antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, wound healing properties and other known biological effects. It is also claimed that the inclusion of plant extracts in the composition of the emulsion strengthens the stability and quality of the emulsion [224].

The extract of oat (*Avena sativa L.*) was selected and included in the composition of the teat dip PR-2 due to its well-known and scientifically proven skin softening and moisturising properties [169, 225] and due to the antioxidant, healing and moisturising effect of plant-derived β -glucans on the skin, and it also performs a technological function – modifies the viscosity of a pharmaceutical or cosmetic product [167]. Calendula extract softens the skin, has anti-inflammatory properties due to the flavonoids present in the plant. Horse chestnut extract strengthens blood vessels in udder skin, normalises blood circulation, and reduces teat oedema. It contains aescin which prevents inflammation. Chestnut extract improves skin elasticity, helps with skin diseases; furthermore, β -escin leads to anti-oedematous and vasoprotective effects, which suppresses inflammation, reduces swelling and relieves pain [163, 164]. Chamomile extract has antiseptic, antibacterial and antifungal properties. It also soothes irritated skin, promotes skin cell regeneration, acts as a mild antiseptic, regenerates skin and reduces itching. Mint essential oil pleasantly cools the skin, repels insects, has an anti-inflammatory effect, has a specific deodorising smell and provides a cooling, stimulating, warming and refreshing effect [226]. It interacts with cold-sensitive TRPM8 receptors in the skin, which are responsible for sensing the cooling effect [227].

Menthol, a component of mint essential oil, has antiseptic, antiviral properties that inhibit the growth of microorganisms and fungi [228]. The herbal additives in the new teat dip formulations were selected due to their therapeutic effect on teat skin, as well as their cooling, moisturizing and softening properties.

Teat dips must have stable physicochemical indicators, i.e. the stability of the formulation must remain throughout the product's shelf life, because in the absence of sufficient stability, the teat dip may lose its antiseptic properties. The importance of stability studies is defined by the Regulation (EU) No 528/2012 [5]. Both real-time and accelerated stability programme tests are designed to reliably assess the following aspects: physical and microbiological stability of products. After carrying out stability tests of EF samples and evaluating the obtained results, it was found that the teat dip maintained stability under recommended and stressful conditions, the pH and viscosity results of the samples were stable, i.e. storage conditions did not significantly affect the rheological properties and physical appearance of the product. A real-time stability study, which usually takes two years, is important to allow the evaluation of the change in physical properties and to justify the shelf life of the biocidal product.

PR-2 and JP-2 dips maintained their stable physical and chemical properties for a period of two years. The colour, homogeneity and odour of the modelled teat dips remained unchanged during the stability programmes and did not separate the product phase.

Other studies have found that viscosity decreases with increasing storage time [230]. This was confirmed ($p < 0.05$) during the study of the experimental formulations CHD-2, PR-2 and JP-2 teat dips.

However, the CHD-2 teat dip was stable only for a year in real-time programmes. Differences in the developed teat dip data were found after 24 months, when the pH value decreased to 5.2–5.3 in all series ($p < 0.25$). During the period of further observation, this product changed visually and did not retain its physical properties.

pH is very important for products that are used on the skin, because it affects the normal functions of skin cells, affects the protective functions of the epidermis, keratinization processes, and creates favourable conditions for normal microbiota of the skin to grow [229, 231]. The pH values of the modelled teat dip formulations in both stability test programmes changed insignificantly towards the acidic side, and the accelerated experimental conditions did not have a statistically significant effect on the pH value – the pH value of PR-2 and JP-2 dips fluctuated within stable, product-specific limits. A change in viscosity parameters was observed in the modelled formulations, however the dyes did not lose their original structure during storage.

Microbiological contamination was not detected in the modelled teat dips during the real-time and accelerated stability programmes. Microbiological quality control of pharmaceutical products is necessary to ensure their safety for the environment, animals and the health of those who use them.

In the production of teat dips, the aim is to achieve texture that is characterised by an aesthetic appearance and suitable mechanical properties – it should be possible to distribute them evenly and easily on the surface, it should remain on the site of exposure for a certain period of time, and it should be convenient to remove the product from the container. During the texture analysis, the obtained data describe the most important physical and mechanical parameters of the products, according to which the sensory properties of the products can be objectively assessed. The texture analysis study was carried out in order to determine which of the samples of the tested products has the best and most acceptable texture properties for consumption and compare them with each other. The samples of the modelled teat dip JP-2 with povidone iodine and xanthan gum were the hardest, strongest and thickest. It is recommended to choose compositions characterised by lower hardness and lower consistency values, but higher viscosity index and cohesiveness values for topically applied teat dips. Such products will spread evenly on the teat, form films of suitable thickness and strength, and will remain longer at the site of exposure. The CHD-2 teat dip samples have a higher cohesiveness force, which means that the samples are more sticky, will hold well on the teat, and will form a film. This is one of the main texture requirements for teat dips. Moreover, the viscosity index was the highest for CHD-2 teat dip samples, which showed the resistance of the sample to separation and run off: the higher this value, the more force is needed to break the sample and the sample will not run off the teat, and a sufficiently thick film will be formed. It is recommended to choose compositions characterised by lower hardness and lower consistency values, but higher viscosity index and cohesiveness values for topically applied teat dips. Such products will spread evenly on the teat, form films of suitable thickness and strength, and will remain longer at the site of exposure. Therefore, when summarizing the results of the texture analysis, it was found that the best textural properties were obtained with the help of guar gum formed by EF CHD-2. These test results are supported by both spreadability and back extrusion test results.

In order to analyse the possibilities of penetration of antiseptic substances into the skin, an *ex vivo* skin penetration study was performed from standard solutions of antiseptic substances and from the selected teat dip. The studies were performed by comparing the penetration through the healthy skin of the teats. The obtained results showed that the amount of CHD penetrated through the skin was below the detection limit. The data of our study coincide

with those published by other authors in the scientific articles. Kakadia and Conway [232] indicate that chlorhexidine digluconate (CHD) is a widely used antiseptic for topical skin antiseptic because it is characterised with low skin penetration. In their study, after 24 h exposure, CHD was only detected in superficial 100 μm sections of the skin ($7.88 \pm 1.37 \mu\text{g}/\text{mg}$), with even lower levels (less than 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$) at 300 μm depth. No full-thickness skin penetration of CHD was detected. Kirkby et al. [233] indicate that an aqueous solution of CHD penetrates the deeper layers of the skin worse than a solution in isopropyl alcohol. The researchers also report that increasing the concentration of CHD in the formulation increases the penetration of CHD *in vitro*. According to researchers, a higher concentration of the medicine on the surface of the skin increases the spontaneous movement of particles from an area of high concentration (skin surface) to an area of low concentration (deeper layers of the skin). In addition, according to the authors, the increased viscosity of the medicine reduces the free movement of drug particles in the formulation, reduces the interaction of drug particles with the skin surface, and at the same time diffuses less through the barrier. PR-2 and CHD-2 in teat dips had different viscosity. In our modelled teat dip, CHD-2 guar gum added to the product 1.6 times more viscosity than in PR-2 dip with xanthan gum.

The penetration of lactic acid from the PR-2 teat dip was reliably lower than that of the control solution. However, skin penetration of lactic acid from teat dip PR-2 was statistically significantly greater than that of chlorhexidine from teat dip CHD-2. PR-2 teat dip contains almost twice the amount of glycerine and sorbitol additive. The latter substances can act as a chemical penetration promoter, displacing water molecules from the intercellular space, increasing the distribution coefficient and solubility of substances in the stratum corneum.

The *ex vivo* study allowed to evaluate and compare the release of antiseptic substances from teat dips of different compositions. With the help of this study method, it is possible to optimise the composition of topical teat dips, select the components, select medicinal substances that would not promote penetration and leave the active substances without passing through the stratum corneum. Scientific studies investigating skin penetration processes with different substances claim that the degree of affinity between the solvent and the penetrating component is one of the most important factors determining skin penetration [233]. Therefore, it is very important to evaluate the role of all components as penetration promoters when composing the formulation of the teat dips.

Not all cow udder antiseptic products used after milking are effective [235], therefore, before starting to use them in production conditions, it

should first be studied *in vitro*, and it should be determined how these substances affect the agents of mastitis prevailing on farms. In a study by Fitzpatrick et al. [54] it was indicated that there must be a common standard for the evaluation of teat antiseptics in the member states of the European Union, that is, the European standard BS EN 1656 and BS EN 1657 used to compare various disinfectants and antiseptics. When tested against these standards, 80% and 50% concentrations of the modelled teat dips had bactericidal activity against the reference cultures $\log R > 5$. The most effective antimicrobial effect was determined in the created teat dip JP-2. This teat dip with concentrations of 80% and 50% inhibited the growth of *S. aureus* ($\log R > 5.48$), *S. uberis* ($\log R > 5.45$), *E. coli* ($\log R > 5.53$) and *C. albicans* ($\log R > 4.53$) strains, a 10% concentration of this dip was also effective, but not against *A. niger* fungal strain. Teat dip PR-2 80% and 50% solutions are effective against *S. uberis* and *E. coli* strains. Low 10% concentrations of teat dips were of lower antimicrobial efficacy. After summarising the results of microbiological tests with reference microorganism cultures, additional continuous microbiological tests with clinical microorganism strains from the cow's environment were carried out for the modelled teat dips. In this study, the teat dips have been determined to have a pronounced antimicrobial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeasts. The EF inhibited *S. aureus* and CoNS strains with higher antimicrobial efficiency. However, depending on the antimicrobial substance contained in the tested EF, the activity against different microorganisms varied. EF CHD-2 was the most active against all bacteria used in the study. This EF with chlorhexidine inhibited the growth of Gram-negative bacteria better ($p < 0.05$) than EF with iodine. However, its activity against *P. mirabilis* and *K. pneumoniae* was lower than that of EF PR-2. The modelled teat dip JP-2 showed effectiveness against *S. aureus*, CoNS and *C. albicans*, and significantly expressed anti *P. zopfii* properties in an *in vitro* study.

In recent years, researchers have analysed a number of teat dips, their composition and the most effective antimicrobial substances. Lactic acid, iodine povidone and chlorhexidine are the most frequently analysed. A comprehensive study by Irish researchers [54] found small differences between the effectiveness and the concentration of the active ingredients in the teat dip. Selected small concentrations of active substances in PR-2, CHD-2 and JP-2 dips formulated an optimal model with a sufficient antimicrobial effect.

Teat dips of original different composition for cows' udder hygiene after milking have been created. The manufacture of the PROFIDIP line of teat dips (manufacturer: UAB Ruvera) was started on the basis of these studies. The created products were the first in Lithuania to compete with imported teat dips. During the development of the teat dips, physical, microbiological

and clinical biopharmaceutical tests were carried out, determining the stability, rheological and textural properties of dips, penetration of antiseptic substances into the skin and antimicrobial efficiency.

The results obtained in the study are important for the successful development and optimisation of post-milking cow udder hygiene products for use on the skin.

Based on the conducted testing and the obtained results, in the future it will be aimed to create teat dips based on natural and organic materials, which are necessary for the development of sustainable dairy farming. The continuation of the study would concern the modelling and evaluation of the EU 2021/1165 compliant teat dip.

Conducted studies have proven that the antiseptic substances contained in teat dips have different antimicrobial effects, so it is necessary to assess the prevalence of pathogenic microorganisms circulating in the farm before use. The obtained results of *ex vivo* biopharmaceutical studies justify and evaluate the differences and regularities in the skin penetration of antiseptic substances and the viscosity-forming components of the teat dip.

CONCLUSIONS

1. During experimental studies, nine experimental formulations (EF) were modelled, combining different antimicrobial substances (lactic acid (PR-1, PR-2, PR-3), iodine povidone (JP-1, JP-2, JP-3) and chlorhexidine digluconate (CHD-1, CHD-2, CHD-3) with natural thickeners, dyes and plant extracts.
2. EF PR-2 and JP-2 (in xanthan gum composition – 0.67%) and EF CHD-2 (in guar gum composition – 0.89%) had the best rheological properties during the comparative study: they visibly painted and evenly coated the skin of the teat, the drop remained for the set time and formed a physical barrier.
3. It was found that:
 - 3.1. EF PR-2 and JP-2 remain stable (at room temperature) for at least 24 months and CHD-2 – for at least 12 months. In all EFs, statistically significant linear strong relationships were established between viscosity and pH parameters (correlation coefficient $r = 0.986$ ($p < 0.001$)).
 - 3.2. EF CHD-2 was characterised by the best textural properties, in which the viscosity is formulated with the help of hydroxypropyl guar lip. This led to a lower thickness and density of the product ($p < 0.05$), but at the same time it was stickier and remained longer

on the surface of the teat. Guar gum resulted in the ability of EF CHD-2 to form a more sticky and optimal film thickness.

3.3. Different penetration of antiseptic substances into the skin of cows' udders was determined:

3.3.1. lactic acid penetrates the teat skin from EF PR-2 1.6 times ($p < 0.05$) less than from the control solution of lactic acid in methanol. The stratum corneum of the skin formed a partial barrier to the penetration of the teat dip's antimicrobial agent;

3.3.2. chlorhexidine from CHD-2 dip does not penetrate the skin of the teat and remains on the surface of the skin, ensuring a local antiseptic of the teat skin.

4. It was found that:

4.1. EFs PR-2, JP-2 and CHD-2 were bactericidally and fungicidally active when determining the effect on the reference cultures of bacteria and yeast *C. albicans*, only the reference strain of the fungus *A. niger* was resistant to the tested teat dips;

4.2. the most antimicrobially active is EF JP-2: even when diluted 10 times, this EF inhibited the growth of reference cultures *S. aureus*, *E. coli* and *S. uberis*;

4.3. EF PR-2, JP-2 and CHD-2 were more effective against clinical *S. aureus* and CoNS strains, but had a weaker effect on gram-negative bacteria, whereas, EF CHD-2 had a broad spectrum of activity and was effective against all tested bacteria;

4.4. pathogenic algae (*P. zopfii*) was best affected by EF JP-2.

RECOMMENDATIONS

1. Selected experimental prototypes of teat dips with different active ingredients are recommended for the production of commercial preparations.
2. The commercial teat dip, produced on the basis of the prototype JP-2 iodine povidone, is recommended for use as an antiseptic for cow teats in a herd where mastitis is caused by *S. aureus*, KNS, *S. uberis*, *P. zopfii* and *C. albicans*.
3. The commercial teat dip, produced on the basis of the prototype CHD-2 chlorhexidine, is recommended for use when mastitis-causing microorganisms are dominated by *S. aureus* and environmental pathogenic microorganisms, such as *S. agalactiae*, KNS, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. enterica*, *C. freundii*, *E. faecium*, *P. zopfii*, and *C. albicans*.
4. The commercial teat dip, produced on the basis of the prototype PR-2 lactic acid, is recommended for mastitis caused by environmental pathogenic microorganisms, such as *S. agalactiae*, KNS, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. enterica*, *C. freundii*, and *E. faecium*.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Miseikiene R, Tusas S, Biziene R, Kerziene S, Miciński J, Matusевичius P. Influence of teat disinfection with iodine preparation on bacterial contamination of teats, hygienic quality and content of iodine in milk. *J. Elem* 2020;25(1):225-236.
2. Lago A, Bruno DR, Lopez-Benavides M, Leibowitz S. Short communication: Efficacy of glycolic acid-based and iodinebased postmilking barrier teat disinfectants for prevention of new intramammary infections in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2016;99:7467-7472.
3. Singh O, Gupta DK, Singh RS, Sharma S, Bansal BK. Comparison of Post Milking Teat Disinfection Alone With Pre and Post Milking Teat Disinfection in the Prevention of Bovine Mastitis. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2019;8:1467-1474.
4. Ozsvari L, Ivanyos D. The use of teat disinfectants and milking machine cleaning products in commercial Holstein-Friesian farms. *Front Vet Sci* 2022;9:956843.
5. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (ES) Nr. 528/2012 2012 m. gegužės 22 d. Prieiga per internetą: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj>
6. Lemmer K, Howaldt S. Test methods for estimating the efficacy of the fast-acting disinfectant peracetic acid on surfaces of personal protective equipment. *J App Microbiol* 2017;123:1168-1183.
7. Chotigarpa R, Lampang NK. Antiseptic effect of natural teat dip containing lactic acid against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Vet World* 2019;12(3):397-401.
8. Hristov S, Stanković B, Samolovac L, Ostojić Andrić D, Nakov D. Hygiene procedures before, during and after cow milking. *Arhiv vet med* 2023;16(1): 5-15.
9. Garvey M, Curran D, Savage M. Efficacy testing of teat dip solutions used as disinfectants for the dairy industry: Antimicrobial properties. *Int J Dairy Technol* 2017;70(2): 179-187.
10. Alves TFR, Morsink M, Batain F, Chaud MV, Almeida T, Fernandes D, et al. Applications of Natural, Semi-Synthetic, and Synthetic Polymers in Cosmetic Formulations. *Cosmetics* 2020;7:75.
11. Elella AHM. Xanthan gum-derived materials for applications in environment and ecofriendly materials: A review. *J Environ Chem Eng* 2021;1:104702.
12. European chemicals agency, Guidance on the Biocidal Products Regulation. 2022; 2:27. Prieiga per internetą: https://echa.europa.eu/documents/10162/2324906/bpr_guidance_vol_ii_part_a_en.pdf/a1602724-7eeb-6d79-d9be-8e95f0d1e102?t=1648525026493
13. Proceedings of the British Mastitis Conference (2010). Sixways, Worcester, p 51-61. The Dairy Group, The University of Nottingham and DairyCo. http://www.britishmastitisconference.org.uk/BMC_2010_Proceedings.pdf#page=74
14. Velázquez-Ordoñez V, Valladares-Carranza B, Tenorio-Borroto E, Talavera-Rojas M, Varela-Guerrero JA, Acosta-Dibarrat J. et al. Microbial Contamination in Milk Quality and Health Risk of the Consumers of Raw Milk and Dairy Products. *Nutrition in Health and Disease – Our Challenges Now and Forthcoming Time*. 2019;244. Prieiga per internetą: <https://www.intechopen.com/chapters/67214>
15. Bastam MM, Jalili M, Pakzad I, Maleki A, Ghafourian S. Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurised milk. *Vet Med Sci* 2021;7:2445-2449.
16. Dėl Pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo. Prieiga per internetą: <https://www.e-tar.lt/portal/legalAct.html?documentId=TAR.9ADAA6261D84>

17. Hohmann MF, Wentz N, Zhang Y, Krömker V. Bacterial Load of the Teat Apex Skin and Associated Factors at Herd Level. *Animals* 2020;10(9):1647.
18. Matuolienė J, Vaičionis G. Antiseptinių vilgiklių panaudojimas karvių spenių dezinfekcijai // *Gyvininkystė: mokslo darbai*. Kaunas. 2004;45:80-87.
19. Hizlisoy H, Onmaz NE, Al S, Karadal F, Yildirim Y, Gonulalan Z. et al. Clonal diversity and antifungal susceptibility of *Candida* spp. recovered from cow milk. *Mljekarstvo* 2020;70(1):40-49.
20. Mbuk EU, Kwaga JKP, Bale JOO, Umoh JU. Molecular identification of yeasts associated with raw cow milk from peri-urban farms in Kaduna State, Nigeria. *JYFR* 2016;7:39-46.
21. Gao J, Liu YC, Wang Y, Li H, Wang XM, Wu Y, et al. Impact of yeast and lactic acid bacteria on mastitis and milk microbiota composition of dairy cows. *AMB Express* 2020;10:22.
22. Berhe G, Wasihun AG, Kassaye E, Gebreselasie K. Milk-borne bacterial health hazards in milk produced for commercial purpose in Tigray, northern Ethiopia. *BMC Public Health* 2020;20:894:1-8.
23. Čereškienė E. Genetinių veiksnių įtaka mastito paplitimui lietuvių pieninių galvijų populiacijoje. *Daktaro disertacija*. Kaunas. 2018;121.
24. Gentilini M, Benavides M L, Pinheiro E, Martins CMMR, Santos M. Quarters with high teat end condition scores are more likely to have new intramammary infections. *NMC Annual Meeting Proceedings* 2016;124-125.
25. Alawneh JI, James AS, Phillips N, Fraser B, Jury K, Soust M, Olchoway TWJ. Efficacy of a *Lactobacillus*-Based Teat Spray on Udder Health in Lactating Dairy Cows. *Front. Vet. Sci* 2020;7:584436.
26. Monstvilienė E. Fizinių, cheminių ir biologinių aplinkos veiksnių tyrimai ir jų įtaka šaltose karvidėse laikomoms karvėms. *Daktaro disertacija*. Kaunas. 2003; 134.
27. Shaheen M, Tantary HA, Nabi SU. A treatise on bovine mastitis: disease and disease economics, etiological basis, risk factors, impact on human health, therapeutic management, prevention and control strategy. *J Adv Dairy Res* 2016; 4:150.
28. Skowron KAF, Sękowska ABDE, Kaczmarek A. Comparison of the effectiveness of dipping agents on bacteria causing mastitis in cattle. *AAEM* 2019;26(1): 39-45.
29. Wei PW, Song CR, Wang X, Chen M, Yang YX, Wang C. et al. A potential milk preservative-Phormicin C-NS, sorbic acid-modified housefly antimicrobial peptide, inhibits *Candida albicans* hypha and biofilm formation. *LWT* 2022;168:113883.
30. Khalaf DD, Soliman MMH, Mansour AS. Conventional and Molecular Identification of Mycotic Mastitis Caused by *Candida* in Farm Animals. *Inter J VetSci* 2021;10(1): 64-68.
31. Vakkamäki J, Taponen S, Heikkilä AM, Pyörälä S. Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Vet Scand* 2017;59(1):33.
32. Tomazi T, Gonçalves JL, Barreiro JR, Arcari MA, Santos MV. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *J Dairy Sc.* 2015;98(5):3071-8.
33. Dego OK, Pacha PA, Gillespie B, Pighetti GM. Experimental *Staphylococcus aureus* Mastitis Infection Model by Teat Dipping in Bacterial Culture Suspension in Dairy Cows. *Animals* 2020;10(5):751.
34. Hannah N P, Ulrike SS, Bradley JH. Effects of Pre-Parturient Iodine Teat Dip Applications on Modulating Aversive Behaviors and Mastitis in Primiparous Cows. *Animals* 2021;11:1623.

35. Osman KM, Hassan HM, Orabi A, Abdelhafez ATS. Phenotypic, antimicrobial susceptibility profile and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* isolated from buffalo and cow mastitic milk. *Pathog Glob Health* 2014;108(4):191-199.
36. Sujata, Dubey KK, Raj T, Kumar P. Chapter 10 – Pathogenic microorganisms in milk: their source, hazardous role and identification. *Advances in Dairy Microbial Products*. 2022;145-161. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85793-2.00005-9>.
37. Refai MK, El-Yazid HA. Yeast infections in domestic and wild animals. *Technical Report*. 2017;18: 194. <https://www.researchgate.net/publication/315816372>
38. Akdouche L, Aissi M, Saadi A. Prevalence and identification of yeasts responsible for mastitis in dairy cattle farms in the SidiLahcene Region in the Wilaya of Sidi Bel abbes-Algeria. *J Adv Dairy Res* 2018;6:206.
39. Refai MK. Monograph on bovine mycoses and mycotoxicosis. *Technical Report* 2017; 118. <https://www.researchgate.net/publication/313773355>
40. Huilca-Ibarra MP, Vasco-Julio D, Ledesma Y, Guerrero-Freire S, Zurita J, Castillejo P. et al. High Prevalence of *Prototheca bovis* Infection in Dairy Cattle with Chronic Mastitis in Ecuador. *Vet Sci* 2022;9:659. <https://doi.org/10.3390/vetsci9120659>
41. Beinbauerova M, Moravkova M, Seydlova R, Crhanova M. Eradication of Bovine Mastitis Caused by the Pathogenic Microalga *Prototheca bovis* on a Dairy Cattle Farm: A Case Report. *Microbiol Res* 2023;14(3):1343-1352.
42. Shahid M, Cobo ER, Chen L, Cavalcante PA, Barkema HW, Gao J, et al. *Prototheca zopfii* genotype II induces mitochondrial apoptosis in models of bovine mastitis. *Sci Rep* 2020;10:698
43. Gonçalves JL, Lee SHI, Arruda EP, Galles DP, Caetano VC, Oliveira CAF et al. Now for something completely different: *Prototheca*, pathogenic algae. *PLoS Pathog* 2021;17(4): e1009362.
44. Shave CD, Millyard L, May RC. Now for something completely different: *Prototheca*, pathogenic algae. *PLoS Pathog* 2021;17(4): e1009362.
45. Breen J, Bradley AJ, Down PM, Hyde RM, Leach KA, Green M. Reducing antibiotic use in the control of mastitis in dairy herds. on: *CABI Reviews* 2021; <https://doi.org/10.1079/PAVSNR202116014>.
46. Trumpickaitė Dzekčiorienė S. Antimikrobinio atsparumo situacija veterinarijoje. Prieiga per internetą: https://www.hi.lt/uploads/Institutas/pranesimai/2021/Antimikrobinis_atsparumas_veterinarijos_sektoriuje.pdf
47. Tommasoni C, Fiore E, Lisuzzo A, Gianesella M. Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. *Animals (Basel)* 2023-08-06;13(15):2538
48. Erskine RJ, Martinez RO, Contreras GA. Cultural lag: A new challenge for mastitis control on dairy farms in the United States. *J Dairy Sci* 2015;98:8240-8244
49. Schabauer A, Zutz C, Lung B, Wagner M, Rychli K. Gentsaldehyde and Its Derivative 2,3-Dihydroxybenzaldehyde Show Antimicrobial Activities Against Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus*. *Front Vet Sci* 2018;5:148.
50. Nickerson SC, Oliver SP. REVIEW: How well have United States dairy producers adopted mastitis-control technologies for reducing herd somatic cell counts improving milk quality? *PAS* 2014;30(2):115-124.
51. Breen J. The Importance of Teat Disinfection in Mastitis Control. *Livestock* 2019; 24:122-8.
52. Oliver SP, Murinda SE. Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2012;28:165-185.

53. Hassan R, Kudi CA, Chiezey NP, Rekwot PI, Egbodo BE, Samuel FU, et al. Mastitis causing pathogens within the environment and teats of milking cows in Zaria, Kaduna state. *J Anim Prod Res* 2016;28(1):8-13.
54. Fitzpatrick SR, Garvey M, Flynn J, O'Brien B, Gleeson D. The effect of disinfectant ingredients on teat skin bacteria associated with mastitis in Irish dairy herds. *Ir Vet J* 2021;74(1):2-12.
55. Kybartas M, Virgailis M, Ružauskas M, Klimienė I, Šiugždinienė R, Merkevičienė L, Štreimikytė-Mockeliūnė Ž, Mockeliūnas R. A Study on the Stability and Antimicrobial Efficacy of a Newly Modeled Teat Dip Solution Containing Chlorhexidine. *Vet Sci* 2023;10:510.
56. Nickerson SC. Choosing the Best Teat Dip for Mastitis Control and Milk Quality. *Proceedings NMC-PDPW Milk Quality Conference*. 2001:43-54.
57. Williamson JH, Lacy-Hulbert SJ. Effect of disinfecting teats post-milking or pre-and post-milking on intramammary infection and somatic cell count. *N Z Vet J* 2013; 61(5):262-8.
58. Rather W, Muhee A, Bhat RA, Haq AU, Parray OR, Taifa S, et al. Effect of novel teat dips on milk biochemical parameters in dairy cattle. *IJCS* 2020;8(3):2060-2063.
59. Ohnstad I. Preventing mastitis infection through teat disinfection. *Livestock* 2015; 20:214.
60. Verdier-Metz I, Delbès C, Bouchon M, Pradel P, Theil S, Rifa E, et al. Influence of Post-Milking Treatment on Microbial Diversity on the Cow Teat Skin and in Milk. *Dairy* 2022;3(2):262-276.
61. Bhakat C, Mohammad A, Mandal DK, Mandal A, Rai S, Chatterjee A, et al. Readily usable strategies to control mastitis for production augmentation in dairy cattle:A review. *Vet World* 2020;13(11):2364-2370.
62. Kamal RM, Bayoumi MA. Efficacy of premilking and postmilking teat dipping as a control of subclinical mastitis in Egyptian Dairy cattle. *Int Food Res J*. 2015;22: 1037-1042.
63. Zened A, Forano E, Delbès C, Verdier-Metz I, Morgavi D, Popova M, et al. Les microbiotes des ruminants: État des lieux de la recherche et impacts des microbiotes sur les performances et la santé des animaux. *INRAE Prod Anim* 2021;33:249-260.
64. Böhm F, Wente N, Krömke V. The efficacy of a foaming iodine-based pre-milking teat disinfectant. *Milchwissenschaft* 2017;70:6-9.
65. Morrill KMJC, Smith S, Dann HM, Gauthier HM, Ballard CS. Evaluation of powdered 0.5% chlorhexidine acetate-based postmilking teat dip compared with a foamed 1% iodine-based postmilking teat dip under cold weather conditions in northern New York. *J Dairy Sci* 2019;102:2507-2514.
66. López-Benavides MG, Hillerton J. E Meeting expectations with the teat disinfectants of today. *British Mastitis Conference 2018, Worcester, UK, 7 November 2018*;33-42 ref.31
67. Gleeson D, Flynn J, O'Brien B. Effect of pre-milking teat disinfection on new mastitis infection rates of dairy cows. *Ir vet J* 2018;71:1-8.
68. Vargova M, Vyrostkova JCE, Veszelits K, Lakticova K, Zigo F. Effectiveness of sanitation regime in a milking parlour to control microbial contamination of teats and surfaces teat cups. *AAEM* 2023;30(1):55-60.
69. Kumar M, Kumar A, Singh K, Jhajharia S, Nain R. Prevention of mastitis in milch animals using post milking teat dip cup by dairy farmers. *Pharm Innov* 2022; SP-11(7): 1420-1421.

70. Yu J, Ren Y, Xi X, Huang W, Zhang H. A Novel *Lactobacilli*-Based Teat Disinfectant for Improving Bacterial Communities in the Milks of Cow Teats with Subclinical Mastitis. *Front Microbiol* 2017;8(1782).
71. Reeves SK, Borchers MR, Bewley JM. Evaluating Teat Skin Condition in Response to Phenoxyethanol as a Post-Milking Teat Disinfectant on Lactating Dairy Cows. *J Dairy Vet Anim Res* 2017;6:291-296.
72. Chaisri W, Pangprasit N, Sriphanasuwana A, Intanon M, Suriyasathaporn W. Screening antimicrobial properties against mastitis pathogens of turmeric extract after combination with various antiseptics. *ThaiJo* 2019;49(3):243-248.
73. Rasool S, Farooq MU, Ahmad SS, Avais M, Abbas S, Ambreen N. Effect of essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Lavandula hybrida* as teat dips to control subclinical mastitis in Friesian dairy cattle. *EJMVS* 2021;02(01):0100014EJMVS
74. Gazzola A, Zucali M, Addis I, Bava L, Morandi S, Pisanu S. et al. Assessment of *Lactococcus cremoris* preparations for the pre- and post-milking teat disinfection. *BMC Vet Res* 2023;10:1-18.
75. Ohnstad IC. Recent developments in milking technology to improve udder health and milking efficiency. *Proceedings of the British Mastitis Conference (2022) Sixways, Worcester*, p. 27-39 The Dairy Group, The University of Nottingham, QMMS and BCVA.
76. Hofmeyr I. Guidelines for teat dipping when temperatures start to plummet. *Stockfarm* 2022;12(3).
77. Chitra P. Efficiency of Mastiguard in prophylactic treatment of subclinical mastitis in dairy cattle in Tiruppur district, Tamil Nadu. *Int J Farm Sci* 2023;13(1):1-5.
78. NMC (National Mastitis Council, 2024). Prieiga per internetą: <https://www.nmconline.org/about-nmc/>
79. Azizoglu RO, Lyman R, Anderson KL. Bovine *Staphylococcus aureus*: dose response to iodine and chlorhexidine and effect of iodine challenge on antibiotic susceptibility. *J Dairy Sci* 2013;96:993-9.
80. Martins CMMR, Pinheiro ESC, Gentilini M, Benavides ML, Santos MV. Efficacy of a free iodine barrier teat disinfectant for the prevention of naturally occurring new intramammary infections and clinical mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2017;100(5):3930-3939.
81. Fitzpatrick SR, Garvey M. Screening commercial teat disinfectants against bacteria isolated from bovine milk using disk diffusion. *Vet World* 2019;12:629-637.
82. 2020 m. VMVT autorizuoti biocidiniai produktai. Prieiga per internetą: <https://vmvt.lt/node/5120>
83. Krupelnytskyi TV. Hygiene products for udder health of lactating cows. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*. 2023;6(1):84-94.
84. Bennett S, Fliss I, Said L B, Malouin F, Lacasse P. Efficacy of bacteriocin-based formula for reducing staphylococci, streptococci, and total bacterial counts on teat skin of dairy cows. *J Dairy Sci* 2022;105:4498-4507.
85. Petri FS. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications *J Appl Polym Sci* 2015;132(23).
86. Kybartas M, Šiugždinienė R, Virgailis M, Mockeliūnas R. A Study of Stability and Antimicrobial Efficacy of a New Model Teat Dip Solution Containing Lactic Acid. *VetZoo* 2022;80(2):53-60.

87. European Parliament and Council Regulation (EC) No. 1272/2008. Prieiga per internetą: <https://www.ecolex.org/details/legislation/regulation-ec-no-12722008-of-the-european-parliament-and-of-the-council-on-classification-labelling-and-packaging-of-substances-and-mixtures-amending-and-repealing-directives-67548eec-and-199945ec-and-amending-regulation-ec-no-19072006-lex-faoc089390>. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1272>
88. Deepthi V, Malathi V, Dodamani P, Kadegowda AKG, Madhura Y, Suresh B N, Jolapure AM. Herbal Teat Care: Effects on Bacterial Count of Milk and Teat Condition. *Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology*, 2024;20(3): 26.
89. Aiensaard J, Borlace GN, Thongkham E, Jarassaeng C. Antibacterial efficacy of essential oil spray formulation for post-milking disinfection in dairy cows. *Vet World* 2023;6(7):1552-1561.
90. Ernst E. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. *Br J Dermatol* 2000;143:923-9.
91. Gawkrödger DJ. *Dermatology, An Illustrated Colour Text*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002.
92. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. Drug safety update: Chlorhexidine: reminder of potential for hypersensitivity. London. Department of Health, 2014. Prieiga per internetą: <http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/DrugSafetyUpdate/CON140701>.
93. 2012 m. gegužės 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 528/2012 dėl biocidinių produktų tiekimo rinkai ir jų naudojimo ir Lietuvos Respublikos Vyriausybės nutarimo „Dėl 2013 m. liepos 24 d. Lietuvos Respublikos Vyriausybės nutarimo „Dėl 2012 m. gegužės 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 528/2012 dėl biocidinių produktų tiekimo rinkai ir jų naudojimo įgyvendinimo pakeitimo“ projekto atitikties. Prieiga per internetą: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.181634?jfwid=32wf8izs>
94. Hoang TPN, Ghorri MU, Conway BR. Topical Antiseptic Formulations for Skin and Soft Tissue Infections. *Pharmaceutics* 2021;13:558.
95. Boomsma B, Bikker E, Lansdaal E, Stuut P. L-Lactic Acid – A Safe Antimicrobial for Home- and Personal Care Formulations. *Sofwjournal* 2015;141:10-15.
96. Alsaheb RAA, Aladdin A, Othman NZ, Malek RA, Leng OM, Aziz R et al. Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *J CPR* 2015;7(10):729-735.
97. Wang C, Chang T, Yang H, Cui M. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella enteritidis* *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2015;47(1): 31-236.
98. Wang C, Cui Y, Qu X. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Arch Microbiol* 2018;200:195-201.
99. Schwenker JA, Schotte U, Hölzel CS. Minimum inhibitory concentrations of chlorhexidine- and lactic acid-based teat disinfectants: An intervention trial assessing bacterial selection and susceptibility. *Dairy Sci* 2021;105:734-747.
100. Lin SC, Huang CF, Shen LJ, Wang HJ, Lin CY, Wu FLL. Formulation and stability of an extemporaneous 0.02% chlorhexidine digluconate ophthalmic solution. *J Formos Med Assoc* 2015;114(2):1162-9.
101. Goel A, Sinha A, Khandeparker R, Mehrotra R, Vashisth P, Garg A. Bioactive glass S53P4 versus chlorhexidine gluconate as intracanal medicament in primary teeth: an in vitro study using polymerase chain reaction analysis. *JIOH* 2015; 7(8):65-69.
102. Calogiuri GF, Di Leo E, Trautmann A, Nettis E, Ferrannini A, Vacca A. Chlorhexidine Hypersensitivity: A Critical and Updated Review. *Allergy&Therapy* 2013;4:2155-6121.

103. Másquio Fiorentino FA, Corrêa MA, Nunes Salgado HR. Analytical Methods for the Determination of Chlorhexidine: A Review. *Crit Rev Anal Chem* 2010; 40(2):89-101.
104. Babickaitė L, Antiseptinio chlorheksidino–poloksamero odos gelio antibakterinio aktyvumo ir terapinio efektyvumo vertinimas. *Daktaro disertacija. Kaunas*. 2019. p. 147.
105. Thongrueang N, Liu SS, Hsu HY, Lee HH. An in vitro comparison of antimicrobial efficacy and cytotoxicity between povidone-iodine and chlorhexidine for treating clinical endometritis in dairy cows. *PLoS One* 2022;17(7):e0271274.
106. Ivanov IB, Gritsenko VA, Kuzmin MD. The Effect of Brief Exposure to Sub-Therapeutic Concentrations of Chlorhexidine Digluconate on the Susceptibility of Staphylococci to Platelet Microbicidal Protein. *Surg Infect (Larchmt)* 2015; 16(3):263-6.
107. Karpinski TM, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine – pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19:1321-1326.
108. Abbaszadegan A, Gholami A, Ghahramani Y, Ghareghan R, Ghareghan M, Kazemi A et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of Cuminum cyminum as an intracanal medicament compared to Chlorhexidine gel. *Iran Endod J* 2016;11(1): 44-50.
109. Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A. Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria – Is There Cause for Concern? *Front Microbiol* 2019;1-10.
110. Kaiho T. *Iodine Chemistry and Applications*. 2015. p. 375-410.
111. Papadopoulou EL, Valentini P. Antibacterial Bioelastomers with Sustained Povidone-Iodine Release. *Chem Eng J* 2018;347:19-26.
112. Zamora JL. Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of povidone-iodine solutions. *AJS* 1986;151(3):400-406.
113. Jamal MA, Perinbam K. Povidone iodine loaded film-forming topical gel and evaluation of its chemical stability. *Int J Res Pharm Sci* 2020;11(1):148-153.
114. Singh T, Sharma M, Singh G. Effect of Post Teat Dip Treatments for the Prevention of Mastitis in Dairy Cattle. *J Krishi Vigyan* 2018;7(1):98-100.
115. Zhang H, Jiang H, Chen D, Shen Z, Mao Y, Liang Y, et. al. Evaluation of a povidone-iodine and chitosan-based barrier teat dip in the prevention of mastitis in dairy cows. *JIA* 2021;20(6):1615-1625.
116. Silva DD, Sampaio de Medeiros E, Maria Betânia de Queiroz Rolim, Marinho AV, et al. In vitro efficacy of iodine in the pre and post dipping against coagulase negative Staphylococcus isolated in milk of cows with subclinical mastitis. *Ciência Rural, Santa Maria*, 2021;51:4, e20200417.
117. Ingawa KH, Adkinson RW, Gough RH. Evaluation of a Gel Teat Cleaning and Sanitizing Compound for Premilking Hygiene. *J Dairy Sci* 1992;75:1224-1232.
118. Phillips HN, Sorge US, Bradley J. Heins Effects of Pre-Parturient Iodine Teat Dip Applications on Modulating Aversive Behaviors and Mastitis in Primiparous Cows. *Animals* 2021;11:1623.
119. Cabeça TK, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL. Activity of disinfectants against foodborne pathogens in suspension and adhered to stainless steel surfaces. *Braz J Microbiol* 2012;43(3):1112-1119.
120. Blowey R, Edmondson P. Mastitis control in dairy herds. United Kingdom. 2000;133-139. Prieiga per internetą: [https://lactoscan.com/editor/ufo/manuals/SCC/Mastitis_Control_in_Dairy_Herds_2nd\(veterinary-student.blogfa.com\).pdf](https://lactoscan.com/editor/ufo/manuals/SCC/Mastitis_Control_in_Dairy_Herds_2nd(veterinary-student.blogfa.com).pdf)
121. Rudejeviienė J. Karvių slaptasis mastitas. *VšĮ „Terra Publica“*. 2007. p. 13-160.
122. Delavenne E, Mounier J, Asmani K, Jany JL, Barbier G, Blay GL. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *IJFM* 2011;151(2):247-251.
123. Stanojevic S, Krnjajic D. Yeast mastitis in cows. *J Food Saf* 2002;1:8-10.

124. Krukowski H, Lisowski A, Nowakowicz-Dębek B, Wlazło Ł. Susceptibility of *Prototheca zopfii* strains isolated from cows with mastitis to chlorhexidine and iodine. *Turk J Vet Anim Sci* 2013;37:106-108.
125. Salerno T, Ribeiro MG, Langoni H, Keller SA, Costa OE., Melville PA, Bueno VFF, et al. In vitro algacide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. *Res Vet Sci* 2010; 88:211-213.
126. Chiofalo B, Lo Presti V, D'Agata A, Rao R, Ceravolo G, Gresta F. Qualitative profile of degummed guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) seeds grown in a Mediterranean area for use as animal feed. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2018; 102:260-267.
127. Thombare N, Mishra S, Siddiqui M, Jha U, Singh D, Mahajan GR. Design and development of guar gum based novel, superabsorbent and moisture retaining hydrogels for agricultural applications. *Carbohydr Polym* 2018;185:169-178.
128. Chivero P, Gohtani S. Effect of xanthan and guar gums on the formation and stability of soy soluble polysaccharide oil-in-water emulsions. *Int Food Res* 2015;70:7-14.
129. Dai L, Wang Y, Li Z, Wang X, Duan Ch, Zhao W, et al. A multifunctional self-crosslinked chitosan/cationic guar gum composite hydrogel and its versatile uses in phosphate-containing water treatment and energy storage. *Carbohydr. Polym* 2020;244: 116472.
130. Gupta S, Variyar SP. Guar Gum: A Versatile Polymer for the Food Industry. *Biopolymers for Food Design*. 2018; p. 383-407.
131. Soltani MD, Meftahizadeh H, Barani M, Rahdar A, Hosseinikhah SM, et al. Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) plant gum: From biological applications to advanced nanomedicine. *IJBioMac* 2021;193:1972-1985.
132. Cofelice M, Messia MC, Marconi E, Cuomo F, Lopez F. Effect of the xanthan gum on the rheological properties of alginate hydrogels. *Food Hydrocoll* 2023;142:108768.
133. Brunchi CE, Morariu S, Iftime MM, Stoica I. Xanthan gum in solution and solid-like state: Effect of temperature and polymer concentration. *J Mol Liq* 2023;387:122600.
134. Akshay Y, Vaibhavi S. Formulation and evaluation of herbal mascara by using Xanthan Gum. *World J Appl Pharm* 2023;1:7-13.
135. Glycerin. Product Safety Assessment. 2014 metai. Prieiga per internetą: http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_091a/0901b8038091a41a.pdf?filepath=productsafety/pdfs/noreg/233-00490.pdf&fromPage=GetDoc; European
136. European Pharmacopoeia, 8th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2013; 2:2346-2348.
137. Becker LC, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, et al. Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics. *IJT* 2019;38(3):6S-22S.
138. Rowe RC, Sheskey PJ, Cook WG, Fenton ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 7th ed. Pharmaceutical Press Avenue and American Pharmacists Association; 2012.
139. Jimenez RX, Young AF, Fernandes HLS. Propylene glycol from glycerol: Process evaluation and break-even price determination. *Renew Energy* 2020;158;181-191.
140. Carrer V, Alonso C, Pont M, Zanuy M, Córdoba M, Espinosa S, et al. Effect of propylene glycol on the skin penetration of drugs. *Arch Dermatol Res* 2020; 312:337-352.
141. Sravan T, Spandana K. Sorbitol – Its Applications in Different Fields. *Agriculture and Food* 2021;3:197-198.
142. Cero DM, Saller R, Marco L, Weckerle CS. Trends of Medicinal Plant Use over the Last 2000 Years in Central Europe. *Plants* 2023;12(1):135.
143. Grigorov M, Kitic D, Pavlovic D. Medicinal plants in dermatological complaints and disorders. *Nat Med Mater* 2022;42:60-67.

144. Wibowo DP, Febriani Y, Riasari H, Aulifa DL. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of medicinal plant *Cymbopogon nardus* from Lembang West Java. *Res J Chem Environ* 2018;22(1):1-4.
145. Suselowati T, Yuhanita SSI, Ardiansyah P, Wahyu D. Evaluation of herbal antiseptic red teak leaf extract (*Tectona grandis* Linn. F.) as teat gel for dairy cow. The 5th International Seminar on Agribusiness 2019. IOP Conf. Ser.: Earth Environ Sci 518 012019.
146. Fiedor J, Burda K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* 2014;466-88.
147. Delia B. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis [online]. Washington; 2015.
148. Marukami T, Kishi A, Yoshikawa M. Medicinal Flowers. IV. Marigold. (2): Structures of New Ionone and Sesquiterpene Glycosides from Egyptian Calendula. *Chem Pharm Bull* 2015;2-7.
149. Sausserde R, Kampuss K. Review composition of carotenoids in calendula (*Calendula officinalis* L.) Flowers. *Foodbalt* 2014;13-8.
150. Pooja V, Studies F, Vihar V, Road R, et al. Antioxidants and Disease Prevention. *IJST* 2014;2(4):903-911.
151. Marukami T, Kishi A, Yoshikawa M. Medicinal Flowers. IV. Marigold. (2): Structures of New Ionone and Sesquiterpene Glycosides from Egyptian Calendula. *Chem Pharm Bull* 2015;49(8):974-978.
152. Rao LG, Rao AV, Brzozowski T. Dietary Carotenoids: Sources, Properties, and Role in Human Health. Intechopen 2024.
153. Kehili S, Boukhatem MN, Belkadi A, Ferhat MA, Setzer WN. Peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil as a potent anti-inflammatory, wound healing and anti-nociceptive drug. *Eur J Biol Res* 2020;10(2):132-149.
154. Al-Dabbagh B, Elhaty IA, Elhaw M, Murali, C, Al Mansoori A, Awad B, Amin A. Antioxidant and Anticancer Activities of Chamomile (*Matricaria Recutita* L.). *BMC Res Notes* 2019;12:3.
155. El Mihaoui A, Silva JCG, Charfi S, Castillo MEC, Lamarti A, Arnao MB. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): A Review of Ethnomedicinal Use, Phytochemistry and Pharmacological Uses. *Life* 2022;12(4):479.
156. Sah A, Naseef PP, Kuruniyan MS, Jain GK, Zakir F, Aggarwal GA. Comprehensive Study of Therapeutic Applications of Chamomile. *Pharmaceuticals* 2022;15:1284.
157. Vougmo JCF. Evaluation of herbal topical applications with *Matricaria recutita*. Masters thesis. Nicosia 2022. p. 48.
158. Flemming M, Kraus B, Rasclé A, Jürgenliemk G, Fuchs S, Fürst R, Heilmann J. Revisited anti-inflammatory activity of matricine in vitro: Comparison with chamazulene. *Fitoterapia* 2015;106:122-8.
159. Pastare L, Berga M, Kienkas L, Boroduskis M, Ramata-Stunda A, Reihmane D, et al. Exploring the Potential of Supercritical Fluid Extraction of *Matricaria chamomilla* White Ray Florets as a Source of Bioactive (Cosmetic) Ingredients. *Antioxidants* 2023;12(5):1092.
160. Stanojevic LP, Marjanovic-Balaban ZR, Kalaba VD, Stanojevic JS, Cvetkovic DJ. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chamomile Flowers Essential Oil (*Matricaria chamomilla* L.). *J. Essent. Oil Bear. Plants* 2016;19:2017-2028.
161. Sánchez M, González-Burgos E, Gómez-Serranillos MP. The pharmacology and clinical efficacy of *Matricaria recutita* L.: a systematic review of in vitro, in vivo studies and clinical trials. *Food Rev Int* 2022;38(8):1668-1702.

162. Oszmiański J, Kalisz S, Aneta W. The content of phenolic compounds in leaf tissues of white (*Aesculus hippocastanum* L.) and red horse chestnut (*Aesculus carea* H.) colonized by the horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimić). *Molecules* 2014;19(9):14625-36.
163. Dudek-Makuch M, Studzińska-Sroka E, Korybalska K, Czepulis N, Luczak J, Rutkowski R, et al. Biological activity of *Aesculus hippocastanum* flower extracts on vascular endothelial cells cultured in vitro. *Phytochem Lett* 2019;30:367-375.
164. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Method* 2014;7:1776-82.
165. Owczarek A, Kolodziejczyk-Czepas J, Woźniak-Serwata J, Magiera A, Kobiela N, Wąsowicz K, Olszewska MA. Potential Activity Mechanisms of *Aesculus hippocastanum* Bark: Antioxidant Effects in Chemical and Biological In Vitro Models. *Antioxidants* 2021;10(7):995.
166. Kukula-Koch W, Kędzierski B, Głowniak K. Influence of extrahent on antioxidant capacity of *Aesculus hippocastanum* seeds. *Nat Prod Res* 2015;29(4):370-3.
167. Kim IS, Hwang CW, Yang WS, Kim CH. Multiple Antioxidative and Bioactive Molecules of Oats (*Avena sativa* L.) in Human Health. *Antioxidants* 2021;10(9):1454.
168. Reynertson KA, Garay M, Nebus J, Chon S, Kaur S, Mahmood K, et al. Anti-Inflammatory Activities of Colloidal Oatmeal (*Avena sativa*) Contribute to the Effectiveness of Oats in Treatment of Itch Associated With Dry, Irritated Skin. *J Drugs Dermatol* 2015;14(1):43-48.
169. Kim HS, Hwang HJ, Seo WD, Do SH. Oat (*Avena sativa* L.) Sprouts Restore Skin Barrier Function by Modulating the Expression of the Epidermal Differentiation Complex in Models of Skin Irritation. *Int J Mol Sci* 2023;24(24): 17274.
170. Nisbar ND, Khair SKJ, Bujang NB, Mohd YA. Determination of ethanol, isopropyl alcohol and methanol in alcohol-based hand sanitiser to ensure product quality, safety and efficacy. *Sci Rep* 2023;13:9478.
171. Garcia-Gavin J, Lissens R, Timmermans A, Goossens A. Allergic contact dermatitis caused by isopropyl alcohol: a missed allergen? *Contact Dermatitis* 2011; 65:101-106.
172. Ahmadi M, Seyedin SH. Investigation of NaOH Properties, Production and Sale Mark in the world. *JMEST* 2019;6(10):10809-10813.
173. Lukić M, Pantelić I, Savić SD. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. *Cosmetics* 2021;8(3):69.
174. Bikash CB, Rashmiranjan M, Sonali M. Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. *Food Front* 2021;2:62-76.
175. Vazquez-Ortega F, Lagunes I, Trigos A. Cosmetic dyes as potential photosensitizers of singlet oxygen generation. *Dyes Pigment* 2020;176: 108248.
176. Chang RK, Raw A, Lionberger R, Yu L. Generic development of topical dermatologic products: formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. *AAPS J* 2013;15:41-52.
177. European Pharmacopoeia, 8th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2013; 1: 24-25, 28-30, 123, 807-809.
178. Yacobi A, Shah VP, Bashaw ED, Benfeldt E, Davit B, Ganes D, Ghosh T, et al. Current Challenges in Bioequivalence, Quality, and Novel Assessment Technologies for Topical Products. *Pharm Res* 2014;31:837-846.
179. Nardi-Ricart A, Linares MJ, Villca-Pozo F, Pérez-Lozano P, Suñé-Negre JM, Bachs-deMiquel L, et al. A new design for the review and appraisal of semi-solid dosage forms: Semi-solid Control Diagram (SSCD). *PLoS One* 2018;13(9): e0201643.

180. International standard ISO 5492:2008; defines terms related to sensory analysis. Prieiga per internetą: <https://www.iso.org/standard/38051.html>
181. Jones DS, Lawlor MS, Woolfson AD. Examination of the flow rheological and textural properties of polymer gels composed of poly(methylvinylether-co-maleic anhydride) and poly(vinylpyrrolidone): rheological and mathematical interpretation of textural parameters. *J Pharm Sci* 2002;91:2090.
182. Sengupta, Soma, et al. Improved Skin Penetration Using In Situ Nanoparticulate Diclofenac Diethylamine in Hydrogel Systems: In Vitro and In Vivo Studies. *AAPS PharmSciTech* 2016;17(2):307-317.
183. Hoshino T, Azuma M, Yamada Y, Titapiwatanakun V, Fujii MY, Yamamoto Y, et al. Measurement of the Water Content in Semi-solid Formulations Used to Treat Pressure Ulcers and Evaluation of Their Water Absorption Characteristics. *Chem Pharm Bull* 2019;67(9):929-934.
184. Gupta S, Raghuvanshi N, Varshneya R, Banat IM, Srivastava AK, Pruthi PA, et al. Accelerated in vivo wound healing evaluation of microbial glycolipid containing ointment as a transdermal substitute. *Biomed Pharmacother* 2017; 94:1186-1196.
185. Peleg M. The instrumental texture profile analysis revisited. *J Texture Stud* 2019; 50(5):362-368.
186. Maslii Y, Ruban O, Bernatoniene J, Kasparavičienė G. Determination of rational pH for carbomer-based dental gel by texture analysis. International Distance Conference „Contemporary Pharmacy: Issues, Challenges and Expectation“. 2020. ISBN 9789955156468. p. 34. Prieiga per internetą: <https://ismu.lt/cris/entities/publication/7d71767a-3397-40da-a615-c63311878522/details>
187. Hurler J, Engesland A, Kermany BP, Škalko-Basnet N. Improved texture analysis for hydrogel characterization: Gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness. *J Appl Pol Sci* 2012;125:180-188.
188. Tafuro G, Costantini A, Baratto G, Francescato S, Busata L, Semenzato A. Characterization of Polysaccharidic Associations for Cosmetic Use: Rheology and Texture Analysis. *MDPI. Cosmetics* 2021;8(3):62.
189. Tai A, Bianchini R, Jachowicz J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. *Int J Cosmet Sci* 2014;36(4):291-304.
190. Abdo JM, Sopko NA, Milner SM. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Med* 2020;28(12):100179.
191. Boer M, Duchnik E, Maleszka R, Marchlewicz M. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Adv Dermatol Allergol* 2016;XXXIII(1):1-5.
192. Abd EYSA, Pastore MN, Telaprolu K, Mohammed YH, Namjoshi S et al. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin Pharmacol Adv Appl* 2016;8:163-176.
193. Quiñones-Vico MI, Fernández-González A, Pérez-Castejón E, Montero-Vílchez T, Arias-Santiago S. Cytotoxicity and Epidermal Barrier Function Evaluation of Common Antiseptics for Clinical Use in an Artificial Autologous Skin Model. *Clin Med* 2021; 10(4):642.
194. Kumar A, Kushwaha V, Sharma PK. Pharmaceutical microemulsion: Formulation, characterization and drug deliveries across skin. *Int J Drug Dev Res* 2014; 6:1-21.
195. Alexander H, Brown S, Danby S, Flohr C. Research techniques made simple: Trans-epidermal water loss measurement as a research tool. *J Investig Dermatol* 2018; 138;2295-2300.
196. European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM. Prieiga per internetą: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC44990>

197. Zuang V, Dura A, Asturiol BD, Batista LS, Berggren E, Bopp S, Carpi D, et al. Non-animal Methods in Science and Regulation. EUR 30553 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg 2021. Prieiga per internetą: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC123531>
198. Bernauer U, Bodin L, Chaudhry Q, Coenraads PJ, Dusinska M, et al. The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation – 12th Revision – SCCS/1647/22. Commission européenne. 2023. Prieiga per internetą: https://health.ec.europa.eu/publications/sccs-notes-guidance-testing-cosmetic-ingredients-and-their-safety-evaluation-12th-revision_en
199. SCCP. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. 28 March 2006. Prieiga per internetą: https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_03.pdf
200. Coderch L, Collini I, Carrer V, Barba C, Alonso C. Assessment of Finite and Infinite Dose In Vitro Experiments in Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2021;13:364.
201. Ellison CA, Tankersley KO, Obringer CM, Carr GJ, Manwaring J, Rothe H, Duplan H. Partition coefficient and diffusion coefficient determinations of 50 compounds in human intact skin, isolated skin layers and isolated stratum corneum lipids. *Toxicol in Vitro* 2020;69:104990.
202. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus įsakymas Nr. B1-866, 2012 m. spalio 21 d. Prieiga per internetą: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.437081?jfwid=lo386y7g2>
203. Colipa guidelines „Guidelines on stability testing of cosmetic products” 2004. <http://www.packagingconsultancy.com/pdf/cosmeticscolipa-testing-guidelines.pdf>
204. Kokybės vadybos sistemos. Reikalavimai (ISO 9001:2015). Lietuvos standartas LST EN ISO 9001. Lietuvos standartizacijos departamentas, 2016.
205. Kosmetikos gaminiai. Geros gamybos praktika. Geros gamybos praktikos vadovas (ISO 22716:2007). Lietuvos standartas LST EN ISO 22716. Lietuvos standartizacijos departamentas, 2008.
206. Gumulka P, Zandarek J, Dabrowska M, Starek M. UPLC Technique in Pharmacy – An Important Tool of the Modern Analyst. *Processes* 2022;10:2498.
207. BS EN 1656:2019. Prieiga per internetą: https://www.en-standard.eu/bs-en-1656-2019-chemical-disinfectants-and-antiseptics-quantitative-suspension-test-for-the-evaluation-of-bactericidal-activity-of-chemical-disinfectants-and-antiseptics-used-in-the-veterinary-area-test-method-and-requirements-phase-2-step-1/?gclid=CjwKCAjw0N6hBhAUEiwAXab-TXYK9JBMcr5jAnT5aIYRqsDvTYwpIZymGwvf5fWEjl_Ws1TZGDXYRoCh4sQAvD BwE
208. BS EN 1657:2016. Prieiga per internetą: <https://www.en-standard.eu/bs-en-1657-2016-chemical-disinfectants-and-antiseptics-quantitative-suspension-test-for-the-evaluation-of-fungicidal-or-yeasticidal-activity-of-chemical-disinfectants-and-antiseptics-used-in-the-veterinary-area-test-method-and-requirements-phase-2-step-1/>
209. Jautrumo antimikrobinės medžiagoms tyrimai. Vilnius 2012. Prieiga per internetą: https://www.hi.lt/uploads/Products/product_176/Jautrumo_antimikrobinems_medziagos_tyrimai.pdf
210. Tiriamųjų pieninių veislių gyvūnų bandų produktyvumo 2022–2023 metų apyskaita 86. Prieiga per internetą: https://www.vic.lt/wp-content/uploads/2024/02/Apyskaita2023_20240214.pdf
211. Gavelis A. Veislės, laktacijos, produkcijos ir mitybos įtakos progesterono koncentracijai kaip karvių reprodukcijos žymeniui piene tyrimas. Daktaro disertacija. Kaunas. 2020. p. 158.

212. Esaflor®. Bio-based polymers for advanced personal care solutions. Available online: https://www.lamberti.com/dam/jcr:3f7c703b-78ad-49f1-95ef-4360ea0fd243/ESAFLOR%20selection%20guide_06%202024_global.pdf (accessed on 07 November 2024).
213. Yanuartono Y, Nururrozi A, Indarjulianto S, Raharjo S, Purnamaningsih H. Mycotic Mastitis in Ruminants. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 2019-08-01;29(2):109-130.
214. Punyani S., Narayana P., H Singh, P Vasudevan Iodine based water disinfection: A review. *JSIR* 2006;65(2):116-120.
215. Enger BD, White RR, Nickerson SC, Fox LK. Identification of factors influencing teat dip efficacy trial results by meta-analysis. *J dairy sci* 2016;12:9900-9911.
216. Russell AD. Chlorhexidine: antibacterial action and bacterial resistance. *Infection* 1986;14(5):212-5.
217. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:79-84.
218. Gilbert P, Moore L. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 2005;99:703-715.
219. Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent* 2020; 103:103497.
220. Evans LKM, Knowles TG, Werret GT, Holt PE. The efficacy of chlorhexidine gluconate in canine skin preparation – practice survey and clinical trials. *J Small Anim Pract* 2009;50(9):458-65.
221. Babickaite L, Ramanauskiene K, Grigonis A, Ivaskiene M, Daunoras G, et al. Determination of antimicrobial activity of chlorhexidine gel. *Acta Pol Pharm* 2016;73(6): 1623-1630.
222. Haghi AK, Ribeiro FCA, Pogliani L, Balköse D, Torrens F et al. *Applied Chemistry and Chemical Engineering* 2018;5:390.
223. Šaltenienė, R. Rankų higiena. Slauga 2017 geguže.indd. Prieiga per internetą: https://www.sskc.lt/uploads/pdf/3_geguze_SLAUGA_1-20.pdf
224. Šlapkauskaitė J. Augalų ir jų ekstraktų antimikrobinių, fitocheminių ir antioksidacinių savybių įvertinimas bei pritaikymas raugintų pieno produktų saugai. *Daktaro disertacija. Kaunas. 2016. p. 208.*
225. Sugondo KN, Hermawan M. The effect of topical oatmeal (*Avena sativa*) on hydration-related skin disorders: A systematic review. *J Gen Proced Dermatol Venereol Indones* 2023;7(1);042-049.
226. Calapai G, Minciullo PL, Miroddi M, Chinou I, Gangemi S, Schmid RJ. Contact dermatitis as an adverse reaction to some topically used European herbal medicinal products – Part 3: *Mentha × piperita* – *Solanum dulcamara*. *Contact dermatitis* 2016; 74(3):131-144.
227. Mehta NJ, Patadiya ND, Patel J, Shastri DH, Shelat PK. Development and evaluation of antiarthritic herbal ointment. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 2013;4(1):221-8.
228. Heydari M, Zanfardino A, Talei A, Shahnejat Bushehri AA, Hadian J, Maresca V, et al. Effect of heat stress on yield, monoterpene content and antibacterial activity of essential oils of *Mentha x piperita* var. Mitcham and *Mentha arvensis* var. *piperrascens*. *Molecules* 2018;23(8):1903.
229. Babickaite L, Grigonis A, Ramanauskiene K, Matusevicius AP, Zamokas G, et al. Therapeutic activity of chlorhexidine-poloxamer antiseptic gel on wound healing in rats: A preclinical study. *Pol J Vet Sci* 2018;21(1):175-183.

230. Stelmakienė A. Puskiečių formuluočių su natūralios kilmės medžiagomis modeliavimas, reologinis ir biofarmacinis vertinimas. Daktaro disertacija. 2017. Kaunas. p. 163.
231. Matousek JL, Campbell KL. A comparative review of cutaneous pH. *Vet dermatol* 2002;13(6):293-300.
232. Kakadia PG, Conway BR. Nanoemulsions for enhanced skin permeation and controlled delivery of chlorhexidine digluconate. *J Microencap* 2022;110-124.
233. Kirkby M, Sabri AB, Scurr DJ, Moss GP. Dendrimer-mediated permeation enhancement of chlorhexidine digluconate: Determination of in vitro skin permeability and visualisation of dermal distribution. *Eur J Pharm Biopharm* 2021;159:77-87.
234. Kobayashi Y, Nakamura H, Sugibayashi K, Morimoto Y. Estimation of action site of L-lactic acid-ethanol-isopropyl myristate mixed system for its enhancing effect on the skin permeation of ketotifen. *Int J Pharm* 1997;156(2):153-162.
235. Mišeikienė R, Šiugždaitė J, Tacas J, Stankevičius H, Pečiulaitienė N. Antiseptikos panaudojimo prieš melžimą įtaka karvių spenių odos ir pieno bakteriniam užterštumui. *Žem ūkio moksl* 2006;3:38-43.

PASKELBTOS PUBLIKACIJOS

„Web of Science DB“ referuojamuose leidiniuose su citavimo rodikliu

1. **Kybartas, Modestas**; Virgailis, Marius; Ružauskas, Modestas; Klimienė, Irena; Šiugždinienė, Rita; Merkevičienė, Lina; Štreimikytė-Mockeliūnė, Žaneta; Mockeliūnas, Raimundas. A Study on the Stability and Antimicrobial Efficacy of a Newly Modeled Teat Dip Solution Containing Chlorhexidine // *Veterinary Sciences*, 2023, t. 10, nr. 8, p. 1-14, ISSN 2306-7381. doi:10.3390/vetsci10080510. Prieiga per internetą: 10.3390/vetsci10080510; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10458168/>; <https://hdl.handle.net/20.500.12512/239597>. Science Citation Index Expanded (Web of Science); Scopus; PubMed; PubMed Central. [S1] [M.kr.: A002] [Citav. rodiklis: 2.4, bendr. cit. rod.: 2.2, kvartilis: Q1 (2022. InCites JCR SCIE)]

Recenzuojamuose mokslo leidiniuose, referuojamuose kitose duomenų bazėse

1. **Kybartas, Modestas**; Šiugždinienė, Rita; Virgailis, Marius; Mockeliūnas, Raimundas. A Study of Stability and Antimicrobial Efficacy of a New Model Teat Dip Solution Containing Lactic Acid // *Veterinarija ir zootechnika*. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademija, 2022, t. 80, nr. 2, p. 53-60, ISSN 1392-2130, 2669-2511. Prieiga per internetą: <https://hdl.handle.net/20.500.12512/119041>; <https://vetzoo.lsmuni.lt/data/vols/2022/8002/pdf/kybartas.pdf>. Academic Search Complete; Academic Search Premier (EBSCO); CAB Abstracts; Central & Eastern European Academic Source (CEEAS); Academic Search Alumni Edition; Scopus. [S1b] [M.kr.: A002]

Pranešimų tarptautinėse konferencijose sąrašas

1. **Kybartas, Modestas**; Ružauskas, Modestas; Šiugždinienė, Rita; Klimienė, Irena; Mockeliūnas, Raimundas. Study of antimicrobial efficacy of teat dip solutions with povidone iodine and chlorhexidine digluconate against *P. zopfii* algae isolated from bovine mastitis milk // *Veterinarija ir zootechnika: 3rd international scientific conference Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy, Faculty of Animal Sciences*. 2023 October 23. Kaunas “Livestock production: Recent trends and future prospects”: Abstracts, t. 81, nr. 2, Suppl., p. 78-78, ISSN 1392-2130, 2669-2511. Prieiga per internetą: <https://vetzoo.lsmuni>.

lt/data/vols/2023/8102/en/SUPPLEMENT.pdf; <https://hdl.handle.net/20.500.12512/243868>. Scopus. [T1a2] [M.kr.: A002]

2. **Kybartas, Modestas**; Ružauskas, Modestas; Šiugždinienė, Rita; Mockeliūnas, Raimundas. Study of the antimicrobial effect of newly-developed teat dips with povidone-iodine, chlorhexidine-digluconate and lactic acid on the bacteria isolated from cow teat skin // 11th International Scientific Conference “Rural Development 2023: Bioeconomy for the Green Deal”: 26–28 September 2023, Lithuania, p. 1-1. Prieiga per internetą: <https://hdl.handle.net/20.500.12512/245634>. [T2] [M.kr.: A002].

DOKTORANTO STRAIPSNĪŲ KOPIJOS, KURIOSE SKELBIAMI SVARBIAUSI TYRIMŲ REZULTATAI

Reprinted with permission from “Veterinarija ir Zootechnika” journal

Veterinarija ir Zootechnika 2022;80(2):53-60

53

A Study of Stability and Antimicrobial Efficacy of a New Model Teat Dip Solution Containing Lactic Acid

Modestas Kybartas, Rita Šiugždinienė, Marius Virgailis, Raimundas Mockeliūnas

Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy, Microbiology and Virology Institute, Kaunas, Lithuania

Keywords: teat dip solution, lactic acid, xanthan gum, stability, viscosity, antimicrobial efficacy.

Abstract. The aim of this study was to make a new teat dip formula containing lactic acid and evaluate its stability and antibacterial activity by physico-chemical and microbiological tests.

After selecting the concentrations of the thickener xanthan gum (0.67%) and lactic acid (6.3%), a teat dip solution was composed, which contains teat skin saving components: glycerol, sorbitol, oat and calendula extracts. According to the recipe, a teat dip solution of orange colour, homogeneous appearance, and a specific lactic acid smell was composed, the viscosity of which was 930–940 mPa*s., pH 2.7. Product physical, chemical properties and stability for 24 months were confirmed by real-time and accelerated stability studies. The teat dip solution remains homogenous, orange colour with a typical lactic acid smell, and did not become cloudy or flaky after 24 months following production. Viscosity reduction was determined after 6 months 33 mPa*s., i.e. it was 3.4%, while after 24 months, it was 12.7%. The measured pH value remains stable between 2.6 and 2.8 ($P > 0.05$). An antimicrobial study was performed according to EN 1656 by 80%, 50% and 10% concentrations with reference *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli* strains. The teat dip solution showed bactericidal efficiency ($\log R > 5$) against *S. uberis* and *E. coli* reference strains. An antimicrobial effect to *S. aureus* was insufficient and the product was not effective against this bacteria. Teat dip at 10% did not show an antimicrobial effect to all tested strains.

According to these data, the new model teat dip solution containing lactic acid, teat skin saving substance and thickener xanthan gum retains unchanged physical parameters and shows bactericidal activity against the reference *E. coli* and *S. uberis* strains.

Introduction

The bacterial colonization on teat skin is an important source for intramammary infection (Hassan et al., 2016). Good sanitation practices can reduce the number of bacteria on teat skin and improve the milk quality, especially the pre-milking and post-milking teat dip (Kučević et al., 2013). Teat disinfection is an important step in the control of mastitis within a dairy herd (Breen, 2019; Fitzpatrick et al., 2021). Depending on the hygiene and sanitary condition of the farm and the method of udder preparation, bacterial contamination of raw milk can decrease by 90%, and the cases of mastitis by 50–75%. Many studies have shown that well-performed teat hygiene reduces the spread of microorganisms that cause inflammation of the mammary gland, and the quality of milk improves. Various sprays, cleaners and teat dip solutions are used today for this purpose. The most widely used procedure is teat dipping. Post-milking dip solutions must have antimicrobial activity, cover the teat surface well and stay on it, moisturize without skin irritation (Oliver & Murinda, 2012; Mišeikienė et al., 2015). Therefore, products intended for cow udder and teat antiseptic – biocides – must contain a bactericidal, disinfecting substance, skin-protecting components

and a thickener – a viscosity-forming substance. The following active substances can be found in veterinary biocides: chlorhexidine, iodine and its compounds, lactic acid, peracetic acid, hydrogen peroxide, and natural polymers guar or xanthan gum are used as thickening components (Nickerson, 2001; Fitzpatrick & Garvey, 2019; Chotigarpa & Lampang, 2019). There are certain requirements for teat dip solutions which are intended for the disinfection of cow udders. One of the most important is the viscosity. After applying this product to the nipple skin, a continuous film should be formed; its purpose is the nipple canal protection from the entry of infectious microorganisms (Garvey & Curran, 2016). The viscosity of solutions can be adjusted by selecting different types of thickeners, so natural thickeners are more common in veterinary medicine pharmacy as well as food industry (Alves, 2020).

Teat dip solutions must contain a disinfectant that does not harm the animal or veterinary and husbandry staff. Lactic acid is widely used in veterinary medicine because it is active against gram-positive and gram-negative bacteria and is not a toxic or dangerous substance. Teat dip solutions based on lactic acid are less harmful to the animal's skin. According to some studies, teat dip solutions which contain 5% lactic acid have noticeable antimicrobial activity against *E. coli*. The previous results have shown that the lactic acid inhibited the growth of other Gram-negative

Correspondence to Modestas Kybartas, Microbiology and Virology Institute of Lithuanian University of Health Sciences. E-mail: kmodestas@yahoo.com

bacteria such as *Shigella* sp., *Salmonella* Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* at 0.5% (In et al., 2013; Wang et al., 2015). Fitzpatrick et al. (2021) also say that, for streptococcal isolates, the product (5% w/w lactic acid) resulted in the numerically largest bacterial reduction of 70.1%.

An important feature of veterinary biocides is that the stability of the solution formula should stay throughout the product's shelf life (European chemicals agency, Guidance on the Biocidal Products Regulation). It means that the teat dip solution should retain stability of physical, chemical properties and show no changes of active substance. Lack of stability leads to diminishing antimicrobial properties.

The aim of this study was to create a new formula teat dip and antimicrobial efficacy and stability evaluation of the new model teat dip solution by physico-chemical and microbiological tests.

Materials and methods

The investigation was carried out in the Institute of Microbiology and Virology (LUHS) and Good Laboratory Practice laboratory (Vimodrone, Italy). A solution formula was developed by selecting and changing the concentration of xanthan gum and dyes so that teat dip properly covered the teat skin, persisted

on the teat a required time and properly coloured the teat skin after dipping. The teat dip solution with lactic acid was produced using pharmacological substances (see Table 1 for composition) according to the technology where dry plant extracts and dyes are dissolved in a portion of purified water and filtered. The filtrate is mixed with sorbitol and glycerine compound and stirred until the solution becomes clear completely. Xanthan gum with the rest of the purified water is added with intensive mixing, and the suspension is homogenized to uniform consistency by a homogenizer (IKA T25 Ultra Turrax). Lactic acid (active substance) is added, and the solution is mixed again with the help of a laboratory mixer (IKA Eurostar 20 digital) to a homogeneous mass. This product is left in a sealed container and, after 24 hours, physico-chemical parameters are determined. The stability testing was carried out according to the guidelines on stability testing of cosmetic products (Colipa, 2004) and guidelines for assessing shelf life using real-time and accelerated stability tests (Magari, 2003). In the real-time study, the product was stored under recommended conditions, and changes of product properties were observed during time intervals (after 24 hours, 6 months, 12 months, and 24 months). When testing the teat dip in an accelerated way, it was placed in stressful conditions:

Table 1. The new model teat dip solution composition (100 g of the final product)

Pharmacological composition/ Chemical compound	Producer	CAS Number	Molecular mass	Compound, g	Notes
L-(+)-lactic acid C ₃ H ₆ O ₃ Also indicated as L-(+)-2- hydroxypropanoic acid	Purac Biochem, The Netherlands	79-33-4	M = 90 g/mol	6.3	pH adjustment and disinfectant
Xanthan gum C ₃₅ H ₄₉ O ₂₉ (monomer)	CP Kelco France, France	11138-66-2	M = 181.21 g/mol	0.67	Thickener
Dye CI 15985 Disodium 6-Hydroxy- 5-[(4-Sulphonatophenyl)Azo]Naph- thalene-2-Sulphonate	Neelikon Food Dyes & Chemi- cals Ltd, India	2783-94-0	M = 452.37 g/mol	0.03	Dye
<i>Calendula officinalis</i> dry extract (Extract Ratio 5:1)	Gonmisol, Spain	84776-23-8	The extract is the mixture of different substances (no molecular mass)	0.03	Antioxidant and anti-inflamma- tory effect
<i>Avena sativa</i> dry extract (Extract Ratio 4:1)	nVH Italia srl, Italy	84012-26-0	The extract is the mixture of different substances (no molecular mass)	0.02	Antioxidant, moisturizing effect
Glycerol 1,2,3-propantriol, C ₃ H ₅ (OH) ₃	Aarhus Kars- hams Sweden AB, Sweden	56- 81- 5	M = 92 g/mol Purity – 100%	9.00	Skin emollient
Sorbitol H(CHOH) ₆ H	Cargill Deutschland GmbH, Germany	50-70-4	M = 182.17 g/mol	1.00	Moisturizer
Water, H ₂ O		7732-18-5	M = 18.01 g/mol	Up to 100 g final product	Diluent

higher temperature, more intense freezing-heating cycle. The accelerated stability test program was carried out after 24 hours of manufacture, and after 2 months. Tests evaluate chemical, physical stability and sensory properties: colour, smell, homogeneity.

Samples of the developed teat dip containing lactic acid were used for further stability studies. Samples were selected and taken in accordance with LST EN ISO 9001 (Quality Management System) and LST EN ISO 227716 (Good Manufacturing Practices for Cosmetic Products) standards. Viscosity was measured at 20°C with a rotary (ND)-1, COMECTA SA) viscometer. The pH measurement was carried out by a standard potentiometric test method with a laboratory pH-meter (InoLab pH 7310). Homogeneity, smell, and colour were determined by a visual method in the Light Cabinet (Byko-Spectra basic).

The microbiological examination was carried out according to MP-S_SVP-6:2020 (Edition I) and the European Pharmacopoeia (7th edition, 2.6.12). Bacteria colonies were counted on Mueller-Hinton Agar II, (BBL, Cockeysville, USA) after incubation at 35°C for 24 hours in aerobic conditions. The total number of aerobic microorganisms CFU/g in the test sample was calculated according to the formula and the final result was given as the number of microorganisms (CFU)/g: $N = \sum C/V \times 1.1 \times d$, kr: ΣC is the sum of the colonies counted in the two evaluated plates from two serial (one by one) dilutions.

Bactericidal activity of the teat dip containing lactic acid was determined according to the standard EN: 1656/2010/AC: 2011 at Good Laboratory Practice laboratory (Vimodrone, Italy). Briefly: 80%, 50%, and 10% concentration teat dip was tested on *S. aureus* ATCC 6538, *S. uberis* ATCC 19436, *E. coli* ATCC 10536. Test conditions: temperature $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Exposure time: 5 min. The nutrient medium Tryptone Soya Agar (TSA) was used in these tests. The indicator of biocide activity against the microorganisms used in the study is expressed as a logarithm. A teat dip solution is considered as bactericidal active if the logarithm value obtained during the test exceeds 5, i.e. $\log R > 5$.

The final product was tested for contamination of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*.

Statistical analysis. Obtained research results were statistically processed using statistical data analysis packages: SPSS 19.0, Microsoft Office Excel 2007. Statistically reliable differences in arithmetic means when $P < 0.05$ between two groups were determined.

Results

The manufacturer's specification for xanthan gum as a thickener has a wide concentration range from 0.5% to 2.5%. According to the limits set by the supplier, the tests were started from the lowest concentration, and it was increased until the required viscosity value was reached and the minimum amount of the thickener was used.

Thus, the determination of the xanthan gum composition started from the lowest amounts, and during the tests, the amount of xanthan gum was increased to 0.67%. We found that this concentration of a thickener was sufficient for the product to meet the viscosity requirements. After laboratory tests, the final teat dip solution viscosity was set to 930–940 mPa*s. After a series of tests, according to the recipes (Table 1), a teat dip solution of orange colour, homogeneous appearance, specific lactic acid smell and pH 2.7 was created. Quality assurance tests were made for possible variation of pH, viscosity, sensory properties (colour, odour and homogeneity) and microbiological parameters.

The tested teat dip solution remained homogeneous throughout the whole stability testing period, bright orange in colour, characteristic of a lactic acid smell. It did not become cloudy, and did not fade after 6, 12, and 24 months after production (Table 2). Changes in the teat dip solution with lactic acid sensual properties were not detected.

Measuring the pH value showed that it remained stable ($P > 0.05$). Evaluation in a real-time programme showed that the pH value did not change statistically significantly. The pH value was in the range of 2.6–2.8, so it was found that the teat dip solution met the initially set requirements. After 24 months, the average value of pH decreased slightly – 0.01 ($P > 0.05$) in the samples from the three tested series in the real-time stability program. After correlation analysis evaluation, it was found that there were statistically significant linear relationships between pH in all teat dip solutions lots. The pH value stability test showed that the teat dip solution containing lactic acid properties did not change significantly ($P > 0.05$) during the 24-months stability testing period. The obtained data are presented in Table 2.

Teat dip solutions viscosity decreased insignificantly during the real-time stability program ($P > 0.05$). A decrease of viscosity was determined after 6 months to 33 mPa*s, compared with the manufactured product: it was 3.4% lower than after production after 6 months, 7.5% after 12 months, and 12.7% after 24 months (Table 2).

The microbiological quality of the new formulated teat dip solutions containing lactic acid was assessed after preparation (emulsion) and the samples were stored and tested at intervals specified in the real stability program (Table 2).

High manufacturing standards of hygiene and components with antimicrobial activity ensure that microbial growth was mostly inhibited in the newly manufactured teat dip solution (Table 2). Total aerobic bacteria count was 1.0×10^1 CFU/g (mL). Microorganisms such *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* in 0.1g of the tested final teat dip solution samples were not detected. During the accelerated stability program, colour, homogeneity, and odour of the new formulated teat dip solution remained

Table 2. The new model teat dip solution containing lactic acid stability data

Time of evaluation	Homogeneity	Colour	Smell	pH	Viscosity, mPa*s	Total count of aerobic bacteria CFU/g (mL)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
Batch No. 1							
After 24 h	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.7	940	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
After 6 months	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.6	910	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
After 12 months	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.7	870	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
After 24 months	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.6	820	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
Batch No. 2							
After 24 h	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.8	940	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
After 6 months	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.8	900	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
After 12 months	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.8	870	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
After 24 months	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.6	830	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
Batch No. 3							
After 24 h	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.6	930	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
After 6 months	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.6	900	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
After 12 months	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.7	860	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified
After 24 months	Homogeneous	Orange	Specific lactic acid	2.6	830	< 1.0 × 10 ¹	Unidentified

unchanged (Table 3). After the centrifugation tests (speed 45 rpm, time 8 min), the investigated samples of the product did not change; they remained stable during the entire study. Samples are considered stable if the product phase does not separate during centrifugation at the specified mode. At this stage of testing, the total number of aerobic microorganisms in 1 g (mL) did not exceed the permitted amounts, no microbial strains of *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *C. albicans* were detected. The accelerated stability program did not detect possible microbiological contamination.

No pH value deviation from the initial value was observed (Table 3) when samples were stored at a lower temperature. It can also be stated that no change in pH value occurred in the samples during freezing/heating cycles and these data remain stable; no statistically reliable decrease in pH value ($P > 0.05$) was found. From the data presented in Table 3, it can be seen that the harder experimental conditions did not have a statistically significant effect on the pH value; the pH value varies in stable and appropriate characteristic limits of the product. During this study, antibacterial activity (*in vitro*) of teat dip solutions was determined by the ability to reduce the total number of microorganisms used in testing. Results were

evaluated according to the standard.

The teat dip solution antimicrobial efficiency test was carried out by evaluating bactericidal tests against reference strains *S. aureus*, *S. uberis*, and *E. coli*, according to the EN 1656 standard. The teat dip solution is considered as bactericidal effective if the logarithm value obtained during the test exceeds 5. The test was performed with 80%, 50% and 10% teat dip solution concentrations. Bactericidal testing showed that 80% and 50% teat dip solution concentrations were bactericidal active against *S. uberis* ATCC 19436 and *E. coli* ATCC 10536 strains ($\log R > 5$, Table 4). After diluting the teat dip solution to 10%, it was not effective in the performed study.

Discussion

The new formulated teat dip solution contains components such a thickener, an antimicrobial active ingredient, moisturizing, teat skin-friendly ingredients, and water. When developing new products and preparing chemical mixtures, it is important that the product is not harmful to the animal and friendly to the environment. For teat dip solutions and other skin surface disinfectants, classification of the chemical mixture is very important. Therefore, during the creation of a new formula teat dip solution, the

Table 3. The new model teat dip solution containing lactic acid data during accelerated stability program

Time of evaluation	Homogeneity	Colour	Smell	pH	Total aerobic microorganisms count CFU/g (mL)	Centrifugation, speed 45 rpm, time 8 min
Batch No. 1						
After manufacturing	Homogenic	Orange	Specific lactic acid	2.7	$< 1.0 \times 10^1$	Stabile
Heating/cooling cycles (10 d. at +4°C; 10 d. +45°C; 10 d. +4°C; 10 d. +45°C; 10 d. 15°C)	Homogenic	Orange	Specific lactic acid	2.7	$< 1.0 \times 10^1$	Stabile
After 2 months. keep at +45°C	Homogenic	Orange	Specific lactic acid	2.6	$< 1.0 \times 10^1$	Stabile
Batch No. 2						
After manufacturing	Homogenic	Orange	Specific lactic acid	2.8	$< 1.0 \times 10^1$	Stabile
Heating/cooling cycles (10 d. +4°C; 10 d. +45°C; 10 d. +4°C; 10 d. +45°C; 10 d. 15°C)	Homogenic	Orange	Specific lactic acid	2.7	$< 1.0 \times 10^1$	Stabile
After 2 months at +45°C	Homogenic	Orange	Specific lactic acid	2.8	$< 1.0 \times 10^1$	Stabile
Batch No. 3						
After manufacturing	Homogenic	Orange	Specific lactic acid	2.6	$< 1.0 \times 10^1$	Stabile
Heating/cooling cycles (10 d. +4°C; 10 d. +45°C; 10 d. +4°C; 10 d. +45°C; 10 d. 15°C)	Homogenic	Orange	Specific lactic acid	2.7	$< 1.0 \times 10^1$	Stabile
After 2 months at +45°C	Homogenic	Orange	Specific lactic acid	2.6	$< 1.0 \times 10^1$	Stabile

classification of the used thickener and antimicrobial substance was taken into account according to the European Parliament and Council Regulation (EC) No. 1272/2008. Xanthan gum is a natural polymer and does not pose a risk to animal health or the environment under this regulation. Also, lactic acid is recognized as safe for use in animal husbandry for surface disinfection.

Disinfectant effect and sufficient thickness are important in biocidal teat dip solutions. Viscosity should be sufficient to form a non-drop emulsion when the teat dip solution is applied to the skin of the teat. Therefore, viscosity is an important physico-chemical parameter of the teat dip solution, reflecting the quality of the product (Elella, 2020; Petri, 2015).

In our study, we paid high attention to obtain the required viscosity. In the study, we chose the natural material that forms the viscosity in the new formula product. Xanthan gum is sufficient when inserted into the product at 0.67%. The product viscosity was statistically reliably stable throughout the entire study period, i.e., 24 months after manufacture.

A disinfectant is a necessary component in teat dip. In veterinary and animal husbandry, one of the most widely used biocides is lactic acid. Lactic acid is recognized by the US and the European Union Commission as a safe food additive for health and its quantities are unlimited. This compound is environmentally friendly and exhibits antimicrobial activity (Storton, 2010). Also, the 2017 EU regulation

Table 4. Antimicrobial activity (log R) of the new model teat dip solutions containing lactic acid (80%, 50%, 10%) according to standard UNI EN 1656

Test microorganisms	Test suspension	Results		
		80%	50%	10%
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶ : >330→>330* 10 ⁻⁷ : 46–35* N: 4.05 x 10 ⁸ No: 4.05 x 10 ⁷ log No: 7.61	Vc: >330→>330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.09 Not active	Vc: >330→>330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.09 Not active	Vc: >330→>330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.09 Not active
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	10 ⁻⁶ : >330→>330* 10 ⁻⁷ : 42–30* N: 3.60 x 10 ⁸ No: 3.60 x 10 ⁷ log No: 7.56	Vc: <14-<14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.41 Active	Vc: <14-<14 Na < 140 log Na < 2.15 log R > 5.41 Active	Vc: >330→>330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.04 Not active
<i>E. coli</i> ATCC 10536	10 ⁻⁶ : >330→>330* 10 ⁻⁷ : 44–49* N: 4.65 x 10 ⁸ No: 4.65 x 10 ⁷ log No: 7.67	Vc: <14 - <14 Na < 140 log Na < 2.15 log R < 5.52 Active	Vc: <14-<14 Na < 140 log Na = 2.15 log R = 5.52 Active	Vc: >330→>330 Na > 3300 log Na > 3.52 log R < 4.15 Not active

* number of colonies (CFU) in test suspension dilutions; N = number of CFU/mL of the test suspension; Vc = viable count; Na = number of CFU/mL of the test mixture; R = reduction in viability. No – number of CFU/mL in the test mixture (diluted).

(<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32017R2002>) confirmed that lactic acid can be used in different types of veterinary products intended for animal skin or surface disinfection. Lactic acid products have been shown to have antibacterial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Boomsma et al., 2015). These ingredients are used in food and cosmetics as preservatives and also have low toxicity; lactic acid is less sensitive to skin irritation (Alsaheb et al., 2015). Many commercial teat antiseptic products have various active ingredients including iodine, hydrogen peroxide, chlorine, and chlorhexidine. Some may cause skin irritation and bacterial resistance (Sadakane et al., 2015). Therefore, pre-preparations of natural products are desirable. The study of Chivero and Gohtani (2015) states that teat dip solutions with lactic acid protect the teat canal from possible infections or inflammations, and the moisturizer film remains effective until the first washing of the skin.

Our newly formulated teat dip solution showed a bactericidal effect. It was confirmed by *in vitro* study against reference isolates. Our study according to the EN 1656 standard showed bactericidal activity at 80% and 50% concentration to reference cultures, as log R > 5 was obtained. World scientists have analyzed the antibacterial effectiveness of teat dip containing lactic acid. Extensive research has been conducted (Fitzpatrick et al., 2021). These researchers tested products containing lactic acid as the main active ingredient. Lactic acid concentrations in these products ranged from 1.76% w/w to 8% w/w. For streptococcal isolates, the product with 5% w/w lactic acid resulted in a numerically largest bacterial reduction of 70.1%. The product with 2% lactic acid combined with 0.6%

w/w chlorhexidine obtained the largest bacterial reduction of 100% against staphylococcal isolates. The product with 1.6% w/w lactic acid combined with hydrogen peroxide was found to result in bacterial reductions of 89.9% and 59.4% for streptococcal and staphylococcal isolates, respectively. This study suggests that some teat disinfectant products achieve a higher reduction in bacterial levels against different specific bacterial groups on teat skin than other teat disinfectant products. However, Chotigarpa (2019) found that no relationship was observed between a higher concentration of active ingredient and increased effectiveness. The scientist notes that the use of a lactic acid-based teat disinfectant reduced the bacterial load on the teat skin and decreased the prevalence of mastitis due to coliforms such as *E. coli*. Important studies on reduced susceptibility to lactic acid teat disinfectants have not been published yet; only resistance mechanisms of lactic acid bacteria coping with acid stress have been observed (Wang, 2018; Schwenker, 2022).

In assessing the quality of pharmaceutical products, stability of physio-chemical parameters is important. When conducting stability studies for biocidal products, it is important to determine whether the quality of disinfectant products is sufficient during the entire shelf life, whether the product maintains its original physical and chemical properties. In case of a decrease of viscosity, film would not form on the skin, which ensures the lowest disinfectant properties by the inability to keep the active substances where they are needed. The importance of stability studies is also defined in Regulation (EU) of the European Parliament and Council no. 528/2012, Title 2 of Annex III, which states that in order to register a

biocidal product in the European Union, it is necessary to submit the results of stability studies at low and ambient temperatures, according to which the shelf life of the biocidal product is determined. For this purpose, two types of stability programs were implemented: real-time and accelerated stability. In real-time stability studies, the product was stored under recommended conditions and monitored for changes in product properties. When testing the product in an accelerated way, the product is placed under stressful conditions: +45°C temperature, heating-freezing cycle. Both real-time and accelerated stability program tests are designed to reliably assess the following aspects: stability and physical integrity of products, chemical and microbiological stability. After carrying out stability tests of the samples and evaluating the obtained results, it was observed that the teat dip solution maintained sufficient stability when stored at low and room temperature; the pH and viscosity results of the samples also showed the stability of the composition. During the stability study, it was found that the storage conditions did not significantly affect the physical product appearance and chemical characteristics of the new formulated teat dip solution.

Microbiological quality control of pharmaceutical products is necessary to ensure their safety for the

environment, the animal and health of the husbandry service personnel. Microbiological contamination of the new formulated teat dip solution was not detected by real and accelerated product stability programs. At accelerated stability program conditions, microbiological contamination did not initiate.

Conclusions

After determining the appropriate thickener xanthan gum and lactic acid concentrations, a new teat dip solution was formulated that also contains glycerol, sorbitol, oat and calendula extracts.

At real and accelerated stability program, the teat dip solution kept unchanged physical parameters such as colour, appearance, homogeneity, smell and viscosity. The pH of the teat dip solution during the study varied slightly.

The teat dip solution showed bactericidal activity against reference *E. coli* and *S. uberis* bacteria (log R > 5). The antimicrobial effect to *S. aureus* was insufficient and the considered product was not effective against this bacteria.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

References

1. Alsaheb R.A.A., Aladdin A., Othman N.Z., Malek R.A., Leng O.M., Aziz R., Enshasy H.A.E. Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *J. Chem. Pharm. Res.* 2015. 7(10):729–735.
2. Alves F.R. Applications of Natural, Semi-Synthetic, and Synthetic Polymers in Cosmetic Formulations, *Cosmetics*. 2020. vol. 7. p. 75.
3. Boomsma B., Bikker E., Lansdaal E., Stuut P. L-lactic acid a safe antimicrobial for home and personal care formulations. *Sofw J.* 2015. 10(141):2–5.
4. Breen J. The Importance of Teat Disinfection in Mastitis Control. *Livestock*. 2019; 24:122–8.
5. Chivero P., Gohiani S. Effect of xanthan and guar gums on the formation and stability of soy soluble polysaccharide oil-in-water emulsions, *Food Research International*. 2015. vol. 70. p. 7–14.
6. Chotigarpa R., Lampang N.K. Antiseptic effect of natural teat dip containing lactic acid against mastitis-causing *Escherichia coli*, *Veterinary World*. 2019. vol. 12 (3). p. 397–401.
7. Colipa guidelines „Guidelines on stability testing of cosmetic products”, 2004.
8. Commission Implementing Regulation (EU) 2017/2002 of 8 November 2017 approving L(+) lactic acid as an existing active substance for use in biocidal products of product-types 2, 3 and 4 (Text with EEA relevance. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32017R2002>).
9. Ellela A.H.M. Xanthan gum-derived materials for applications in environment and ecofriendly materials: A review, *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2020. DOI:10.1016/j.jece.2020.104702.
10. EN 1656:2009/AC:2010 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectant and antiseptics used in veterinary field. Test methods and requirements (Phase 2/step 1).
11. European chemicals agency, Guidance on the Biocidal Products Regulation, vol. 2, version 3.0. 2018. P. 67.
12. European Pharmacopoeia (7th edition, 2.6.12).
13. Fitzpatrick S.R., Garvey M. Screening commercial teat disinfectants against bacteria isolated from bovine milk using disk diffusion. *Veterinary World*. 2019. vol. 12. P. 629–637.
14. Fitzpatrick S. R., Garvey M., Flynn J., O'Brien B., Gleeson D. The effect of disinfectant ingredients on teat skin bacteria associated with mastitis in Irish dairy herds. *Irish Veterinary Journal*. 2021. V. 74, N:1. P. 2–12.
15. Garvey M., Curran D. Efficacy testing of teat dip solutions used as disinfectants for the dairy industry: Antimicrobial properties, *International Journal of Dairy Technology*. 2016. vol. 69. P. 179–187.
16. Hassan R., Kudi C.A., Chiezey N.P., Rekwot P.I., Egbodo B.E., Samuel F.U., Maikaji F.S., Bello T.K. Mastitis causing pathogens within the environment and teats of milking cows in Zaria, Kaduna state. *J. Anim. Prod. Res.* 2016. 28(1):8–13.
17. In Y.W., Kim J.J., Kim H.J., Oh S.W. Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against *Shigella* species. *J. Food. Saf.* 2013. 33(1). P. 79–85.
18. Kučević D., Plavšić M., Trivunović S., Radinović M., Kučević D.S. Effect of post-milking teat dipping on hygienic quality of cow's milk. *Biotechnol. Anim. Husbandry*. 2013. 29(4). P. 665–673.
19. LST EN ISO 227716 (Good Manufacturing Practices for Cosmetic Products) standart.
20. Magari R.T. „Assessing Shelf Life Using Real-Time and Accelerated Stability Tests”, *BioPharm International*. 2003.
21. Mišeikienė R., Rudejeviėnė J., Gerulis G. Effect of pre-milking antiseptic treatment on the bacterial contamination of cow teats' skin *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2015. N. 2. P. 159–166.
22. Nickerson S.C. Choosing the Best Teat Dip for Mastitis Control and Milk Quality. *Proceedings NMC-PDPW Milk Quality Conference*. 2001. P. 43–54.
23. Oliver S.P., Murinda S.E. Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. *Veterinary Clinics: Food Animal*. 2012. V. 28. P. 165–185.
24. Petri F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2015. vol. 132. DOI: 10.1002/APP.42035.

25. Regulation (EU) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council.
26. Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council.
27. Sadakane K., Ichinose T. Effect of the hand antiseptic agents benzalkonium chloride, povidone-iodine, ethanol, and chlorhexidine gluconate on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Int. J. Med. Sci.* 2015. 12(2), P. 116–125.
28. Schwenker J.A., Schotte U., Hölzel C.S. Minimum inhibitory concentrations of chlorhexidine- and lactic acid-based teat disinfectants: An intervention trial assessing bacterial selection and susceptibility. *Journal of Dairy Science*. V.105, 2022, p. 734-747.
29. Storton M., Exarchakis J., Waters T, Hao Z. Lactic acid quantitation in hand dishwashing liquid using an HILIC-UV methodology. *Journal of separation science*. 2010. Vol. 33, P. 982-987.
30. Wang C., Chang T., Yang H., Cui M. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella* Enteritidis *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2015. 47(1). P. 31–236.
31. Wang C., Cui Y., Qu X. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Arch. Microbiol.*, 200 (2018). P. 195-201.

Received 21 October 2022

Accepted 1 December 2022

Article

A Study on the Stability and Antimicrobial Efficacy of a Newly Modeled Teat Dip Solution Containing Chlorhexidine

Modestas Kybartas ^{*}, Marius Virgailis, Modestas Ruzauskas, Irena Klimienė, Rita Šiugždinienė, Lina Merkevičienė, Žaneta Štreimikytė-Mockeliūnė and Raimundas Mockeliūnas

Microbiology and Virology Institute, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences, 47181 Kaunas, Lithuania; marius.virgailis@lsmuni.lt (M.V.); modestas.ruzauskas@lsmuni.lt (M.R.); irena.klimiene@lsmuni.lt (I.K.); rita.siugzdiniene@lsmuni.lt (R.Š.); lina.merkeviciene@lsmuni.lt (L.M.); zaneta.streimikyte@lsmu.lt (Ž.Š.-M.); raimundas.mockeliunas@lsmuni.lt (R.M.)

* Correspondence: modestas.kybartas@lsmu.lt; Tel.: +370-612-51-240

Simple Summary: Bovine mastitis is one of the most widespread cow diseases, which causes high economic losses. Local treatment using natural ingredients instead of the systematic use of antibiotics can decrease the development of antimicrobial resistance. The aim of the study was to determine the physico-chemical properties, stability and antimicrobial effect of a newly formulated biocide for post-milking udder hygiene containing a thickener made from hydroxypropyl guar gum, an antiseptic chlorhexidine digluconate and teat skin-friendly components, including glycerol, *Mentha Arvensis* herbal oil and *Aesculus hippocastanum* extract. The product remains stable and homogenous for at least 12 months. The product also has good antimicrobial properties against the main mastitis pathogens, including *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*.



Citation: Kybartas, M.; Virgailis, M.; Ruzauskas, M.; Klimienė, I.; Šiugždinienė, R.; Merkevičienė, L.; Štreimikytė-Mockeliūnė, Ž.; Mockeliūnas, R. A Study on the Stability and Antimicrobial Efficacy of a Newly Modeled Teat Dip Solution Containing Chlorhexidine. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, 510. <https://doi.org/10.3390/vetsci10080510>

Academic Editors: Chang-min Hu, Heng Wang and Jie Chen

Received: 12 June 2023

Revised: 1 August 2023

Accepted: 4 August 2023

Published: 8 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Despite much focus on mastitis as an endemic disease, clinical and subclinical mastitis remains an important problem for many herds. Reducing the usage of antibiotics for mastitis treatment allows the risks to be minimized related to the development of antimicrobial resistance and the excretion of antibiotics into the environment. The aim of the study was to determine the physico-chemical properties, stability and antimicrobial effect of a newly formulated biocide for post-milking udder hygiene containing a thickener made from hydroxypropyl guar gum, an antiseptic chlorhexidine digluconate and teat skin-friendly components including glycerol, *Mentha Arvensis* herbal oil and *Aesculus hippocastanum* extract. Hydroxypropyl guar gum was used as a thickener to provide the physical parameters and to retain the viscosity at 1438 mPa.s. The physical and chemical properties of the product, including the 12-month stability, were tested in long-term and accelerated stability studies. The product was effective against the primary mastitis pathogens, including *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*.

Keywords: teat dip solution; chlorhexidine; antimicrobial efficacy; stability; viscosity; hydroxypropyl guar gum

1. Introduction

Despite the extensive focus on mastitis as an endemic disease, clinical and subclinical mastitis remains an important problem for many herds. The disinfection of teats after milking reduces the number of new mastitis infections (IMIs) by 50–70%, particularly those caused by contagious mastitis pathogens, and it achieves more variable effects for environmental pathogens [1]. Teat disinfection is a very integral part of the prevention of mastitis, which helps to reduce the risk of pathogens transmission between animals [2]. There is clear evidence that the incidence of new IMIs caused by a wide variety of pathogens was much lower after post-milking teat disinfection. Moreover, this inexpensive and

simple technique ensured reduced bulk milk SCC during lactation and had fewer teat skin abnormalities compared with cows without disinfection [1,3]. For this reason, post-milking teat disinfection is included into many mastitis control programs.

Post-milking dip solutions should include certain features suitable for teat hygiene: they must have antimicrobial activity, quickly cover the teat and properly remain on the surface for a certain period; they must be the right pH in order not to irritate the skin; and they must perform a moisturizing effect to keep the skin soft, rather than cracked, and help any minor wounds to heal more quickly [4,5]. Therefore, antiseptics which are used for cow udders after milking may contain bactericidal and bacteriostatic substances. The use of different active substances in biocides provides a broad spectrum of disinfection. Polymers of guar or xanthan or guar gum provide thickening viscosity to biocides. As a result, the teat dip solution stays on the teat for the right amount of time [6–9].

The teat dip products should contain a disinfecting agent which is friendly to the skin of the teats and is not harmful to people working with animals. That agent is chlorhexidine, which is extensively utilized in veterinary medicine. Chlorhexidine can be used to disinfect the skin of animals; antiseptics of this type are widespread for the udder hygiene of cows before and after milking [6]. Thanks to using post-milking hygiene products containing chlorhexidine, according to the authors, the udder is protected from various inflammations and microorganisms that can enter into the teat canal. At high concentrations (>0.1%), CHX caused a leakage of all the main intracellular components out of the cell, resulting in a bactericidal (cell lysis and death) effect. At low concentrations (0.02–0.06%), CHX caused a displacement of Ca^{2+} and Mg^{2+} and losses of K^+ from the cell wall, resulting in a bacteriostatic effect. Therefore, teat disinfection with chlorhexidine is an important tool in reducing the incidence of bovine mastitis [10].

Despite the biocidal properties, an important physical aspect is viscosity and thickness. After the dipping on the teat, skin creates a protective film that protects the teat canal from pathogens [11]. Viscosity can be adjusted by choosing different types of thickeners and their different concentrations. They also help maintain product stability and improve rheological properties [12]. In our opinion, the color of the teat dip is not of less importance, as the teat dip should be seen on the skin; i.e., the substance should contain a dye that gives a color to the product that acts as a control marker for the personnel and equipment. The efficient teat dip should be chosen taking into account its composition, the proportion of the materials and the combined stability and effectiveness. Biocidal products must maintain sufficient stability throughout their shelf life. The viscosity, pH, color, homogeneity stability, and odor intensity must remain.

The aim of this study was to determine the physico-chemical properties, stability and antimicrobial effect of a newly formulated biocide for post-milking udder hygiene containing a thickener made from hydroxypropyl guar gum, an antiseptic chlorhexidine digluconate and teat skin-friendly components, including glycerol, *Mentha Arvensis* herbal oil and *Aesculus hippocastanum* extract.

2. Materials and Methods

2.1. Place and Study Design

Investigations were carried out at the Institute of Microbiology and Virology, Lithuanian University of Health Sciences, as well as at the laboratory of Chelab S.R.L. in compliance with Good Laboratory Practices, Resana, Italy. The research was carried out in compliance with the Republic of Lithuania's Animal Welfare and Protection Act (no. 108-2728; 2012, no. 122-6126). The study approval number was G2-227, which was issued by the Lithuanian State Food and Veterinary Service. The study design is presented in Table 1.

2.2. Development and Preparation of Teat Dip Solution

The solution formula was formulated by carefully selecting and adjusting the concentrations of the hydroxypropyl guar gum in order to achieve an appropriate viscosity and teat skin color after dipping. Chlorhexidine was used as the antimicrobial substance

whereas plant extracts were included as antiseptic and skin-conditioning ingredients. All ingredients used for the development of the new model of teat dip solution are presented in Table 2.

Table 1. Short study design for development and testing of the teat dip solution.

1.	Development of experimental compositions of teat dip solution
2.	Evaluation and selection of experimental formulations (in vivo)
3.	Evaluation of the stability of the physico-chemical parameters of the selected composition
	Viscosity pH Appearance of teat dip solution Stability
4.	Study of the antibacterial and antifungal effects of the selected composition

Table 2. Composition of the developed new model teat dip solution (100 g product).

Product Composition	CAS No.	Molecular Mass	Manufacturer	Quantity, g	Function	
Chlorhexidine digluconate (D-gluconic acid, compound with N,N'-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino- 2,4,11,13-tetraazatetradecanediamidine (2:1), C ₂₂ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀ × 2C ₆ H ₁₂ O ₇)	18472-51-0	M = 897.77 g/mol	Medichem, S.A., 08970 Sant Joan Despi, Spain	0.50	Active substance (antimicrobial properties)	
Hydroxypropyl guar, C ₃ H ₈ O ₂ × (isomer)	39421-75-5	M = 536.44 g/mol	Lamberti SpA, 21013 Gallarate, Italy	No.1	0.50	Stabilizer, thickener, viscosity modifier
				No.2	0.89	
				No.3	1.20	
Dye CI 16255 (Trisodium (8Z)-7-oxo-8-[(4-sulfonatophthalen-1- yl)hydrazinylidene]naphthalene-1,3- disulfonate), C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃)	2611-82-7	M = 604.46 g/mol	Neelikon Food Dyes & Chemicals Ltd., 402116 Dhatav, Maharashtra, India	No.1	0.02	Colorant
				No.2	0.05	
				No.3	0.12	
Glycerol (1,2,3-propantriol), C ₃ H ₅ (OH) ₃	56-81-5	M = 92.09 g/mol	Aarhus Karshams Sweden AB, 37431 Karlshamn, Sweden	5.10	Skin emollient, moisturizer	
<i>Mentha arvensis</i> herb oil (L-Menthol ≥ 35.0%, Menthone (17.0–25.0%, Cineole ≤ 1.0%, Isomenthone ≥ 13.0%, Menthylacetate 2.0–6.0%)	90063-97-1	The oil is blend of various substances *	Düllberg Konzentra GmbH & Co. KG, 22335 Hamburg, Germany	0.10	Cooling, antiseptic, perfuming function	
<i>Aesculus hippocastanum</i> dry extract from seeds (Aescin 18.0–22.0%) (Extract Ratio 7:1) (Extraction solvent: Ethanol/Water (40/60 v/v))	8053-39-2	The extract is blend of various substances *	Dorana Naturae, 81108 Bratislava, Slovakia	0.01	Antioxidant, skin conditioning and protecting effect	
Polysorbate 80, C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	9005-65-6	M = 1310.00 g/mol	Oleon NV, 9940 Evergem, Belgium	3.00	Emulsifier	
Isopropyl alcohol, C ₃ H ₇ OH	67-63-0	M = 60.10 g/mol	Rebain I International NL, 3059 LM Rotterdam, The Netherlands	5.00	Solvent	
Sodium hydroxide, NaOH	1310-72-2	M = 92.09 g/mol	Stanchem Sp. z o.o., 21025 Niemce, Poland	q.s.	pH adjustment	
Citric acid monohydrate, C ₆ H ₈ O ₇ × H ₂ O	5949-29-1	M = 210.14 g/mol	Reachem s.r.o, 83103 Bratislava, Slovakia	q.s.	pH adjustment	
Purified water, H ₂ O	7732-18-5	M = 18.01 g/mol		Up to 100 g	Solvent	

PS.—* no molecular mass.

The modeling of the initial experimental compositions used for the teat dip solution was carried out through an analogous method and by varying the amounts of the viscosity-regulating material and dye, with three experimental compositions being prepared. See Table 2 for the compositions. Hydroxypropyl guar gum was dispersed in purified water using an IKA ULTRA-TURRAX® T 25 digital laboratory homogenizer (IKA-Werke GmbH

& Co. KG, Staufen, Germany), and, if necessary, the pH of this solution was adjusted to 6.5–6.8 with citric acid. *Mentha arvensis* herb oil and glycerol were dissolved in isopropyl alcohol. *Aesculus hippocastanum* dry extract and dye were dissolved in purified water and filtered. Polysorbate 80 was dissolved in the remaining purified water, and the pH of this solution was adjusted with sodium hydroxide when needed to achieve an appropriate pH range of 5.8–6.1. A mixture of isopropyl alcohol, glycerol and *Mentha Arvensis* herb oil was gradually added to the hydroxypropyl guar gum solution. Thereafter, a mixture of *Aesculus hippocastanum* dry extract and dye was added, mixed and then polysorbate 80 was added. During the last stage of the mixing process, a 20% solution of chlorhexidine digluconate was added to the mixture, and the solution was mixed again using a EUROSTAR 20 digital laboratory stirrer (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany) at a speed of 1250 rpm for 10 min to obtain a homogeneous mass. The equilibration of the modeled experimental compositions (EC) was carried out for 24 h at room temperature (15–25 °C).

2.3. In Vivo Testing

The in vivo study was carried out in order to evaluate the compliance of the simulated three experimental compositions with the provided requirements. The in vivo study was carried out in 2019–2021 at a dairy cow farm located in Siauliai district, Lithuania. The dairy farm houses 450 cows of the Lithuanian Red breed, with an average productivity of 10,500 kg per lactation. Cows are milked in the milking parlor twice a day. The in vivo study was carried out with 75 cows; i.e., three test groups of 25 cows each were formed to evaluate each experimental composition. After milking, cow teats were dipped immediately with EC solution up to 3/4 of the teat length. During the in vivo study, physical tests of the experimental compositions were performed: color, dripping immediately after dipping, formation of a drop on the teat end, teat covered with a film, evenness of teat coverage. The protocols record the values of the research indicators by visually applying a 5-point system. The evaluation criteria are presented in Table 3. The composition with the highest score was selected for further study.

Table 3. Evaluation criteria of experimental teat dip solutions in vivo.

Parameters	Evaluation Criteria
Color	
1 point	After dipping, the color is hard to see. After 60 min, no color is visible.
2 points	After dipping, the color is bright and lasts well for 10 min. After 60 min, the color is hard to see.
3 points	After dipping, the color is bright and lasts well for 10 min. After 60 min, the color did not change. After 12 h, the remains of the color are not visible.
4 points	After dipping, the color is bright and lasts well for 10 min. After 60 min, the color did not change. After 12 h, the color residues are visible only on part of the teats.
5 points	After dipping, the color is bright and lasts well for 10 min. After 60 min, the color did not change. After 12 h the remains of the color are visible.
Dripping immediately after dipping	
1 point	After dipping, the dripping is intense (more than 6 drops in the first minute).
2 points	After dipping, the dripping is intense (4–6 drops in the first minute).
3 points	After dipping, the dripping is moderate (2–4 drops in the first minute).

Table 3. Cont.

Parameters	Evaluation Criteria
4 points	After dipping, the dripping is slow (no more than 2 drops in the first minute).
5 points	No dripping after dipping (no more than one drop in the first minute).
Formation of a drop on the teat end	
1 point	The drop does not form; dripping is too intense.
2 points	After 5 minutes, an elongated drop is formed that does not fall off. After 30 min, the hanging drop is no longer visible.
3 points	After 5 minutes, an elongated drop is formed that does not fall off. After 60 min, the hanging drop is no longer visible.
4 points	After a few (2–3) minutes, a stable hanging drop is formed, which lasts for about 40 min. After 60 min, the hanging drop is no longer visible.
5 points	After a few (2–3) minutes, a stable hanging drop is formed. After 60 min, the hanging drop is visible.
Teat covered with a film	
1 point	Covers with a very thick film, high product yield.
2 points	Covers with a thick film, high product yield.
3 points	Covers with a thin film, which becomes even thinner and unstable due to heavy dripping.
4 points	Covers the skin of the teat with a sufficiently even film, in a sufficiently even layer.
5 points	Covers the skin of the teat with an even film, in an even layer.
Evenness of teat coverage	
1 point	Covers unevenly.
2 points	Covers satisfactory evenly.
3 points	Covers averagely evenly.
4 points	Covers evenly enough.
5 points	Covers evenly.
General evaluation of experimental formulations of the teat dip solution	
Total points	

2.4. Stability Testing

The stability evaluation was conducted in accordance with the guidelines for the stability testing of cosmetic products [13,14]. In the study conducted in an accelerated way, a regime of increased temperature was applied (2 months at +45 °C and 75 ± 5% relative humidity), more intense heating/cooling cycles (10 days at +4 °C; 10 days at +45 °C; 10 days at +4 °C; 10 days at +45 °C; 10 days at 15 °C, and 75 ± 5% relative humidity). The accelerated stability tests were performed twice: one day after manufacturing and after storage at the specified conditions. When testing a teat dip solution in the long-term study, the product samples were stored, and changes of the product characteristics were assessed after a day, after half a year, after 1 year, and after 2 years, under the recommended study conditions (25 ± 2 °C temperature and 60 ± 5% relative humidity). A “Binder KBF” (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany) climate box was used for the long-term and accelerated stability test. The samples were stored in sealed containers, and their protection from light was ensured by covering the containers with a layer of foil. Evaluation of the chemical composition, physical stability and sensory properties, including color, odor and homogeneity were further investigated.

2.5. Evaluation of Physical Properties and Chemical Composition

The viscosity of the newly formulated teat dip solution was determined using the standard test method (STM), which was prepared according to the European Pharmacopoeia (Ph.Eur.) [15]. Viscosity measurements were performed at 20 °C utilizing a rotary NDJ-1 viscometer manufactured by COMECTA S.A. (Italy).

Three measurements were taken for each sample, and the average was calculated. Absolute viscosity was calculated using the following formula: $\eta = k \times \alpha$, where η —absolute viscosity; k —coefficient (selected according to the table in the viscosimeter instructions); and α —a number showing the value of the indicator.

The pH measurement was conducted with a laboratory InoLab pH 7310 pH-meter (Xylem Analytics Germany GmbH, Oberbayern, Germany) using a standard potentiometric test method, which was prepared according Ph.Eur. [15]. The centrifugation test of the final product was performed after a heating/cooling cycle and after 2 months keeping the dip at +45 °C. Briefly, 8 mL of experimental, newly formulated teat dip solution was added to the CLEARLine® centrifuge tubes and centrifuged at a speed of 4500 rpm for 8 min. In order to evaluate the stability of the experimental new teat dip solution formula, separation of the aqueous phase and turbidity were observed. The centrifugation test was performed with an EBA 20 laboratory centrifuge (Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Germany).

Odor, color and homogeneity were assessed using the Light Cabinet (Byko—Spectra Basic). The visual method was used for the evaluation of the homogeneity. Briefly, four samples of 0.02 g of the test product were prepared using two glass slides. The dip solution was placed on a single slide and pressed by the other slide firmly. Spots with a diameter of 2 cm were formed. When viewed through the light at a distance of 30 cm, at least three of the four samples are free of individual particles. If particles were observed in a larger number of samples, the product was considered to be non-homogeneous.

For the odor testing, a small (0.5–2.0 g) sample was added to a chemical beaker, and after 15 min, an odor was detected organoleptically [15]. The evaluation was given by referring to the characteristic odor of the product.

Color determination was performed by a visual method [15]. The test procedure involved examining a thin layer of the product against a white background, and the rating was given by referring to the color characteristic for the product.

2.6. Antimicrobial Testing of the Prepared Teat Dip

The antimicrobial activity of the teat dip solution containing chlorhexidine was assessed using the dilution–neutralization method under experimental conditions according to the BS EN 1656:2019 and BS EN 1657:2016 standards [16]. For antimicrobial activity testing, the strains used were *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Streptococcus uberis* ATCC 19436, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus niger* ATCC 16404. The logarithm was used to express the indicator of product activity against the microorganisms used in the study. If the logarithm value obtained during the test exceeded 5 ($\log R > 5$), the teat dip solution was considered as acting as a bactericidal substance. Antifungal (against the yeasts and fungi) activity was considered if the log exceeded 4, i.e., $\log R > 4$. The logs were counted according to the formula: $\log R = \log N_o - \log N_a$.

2.7. Statistical Analysis

The results were analyzed using statistical data analysis packages: SPSS 17.0 and Microsoft Office Excel 2010. Applying the paired-samples *t*-test, the significance of the differences in the results was determined, which is recorded when $p < 0.05$.

3. Results

During the study, the simulation of the teat dip with chlorhexidine was carried out according to the instructions in the methodology, and the selected ingredients were used (Table 2).

While optimizing and selecting the composition for the experimental solution, an *in vivo* study was performed. The formation of a simulated teat dip solution drop on the end of the teat and its retention time were evaluated, i.e., whether the teat dip solution properly covered (“closed”) the teat channel and its integrity, the formation of a protective film, visibility (the color was evaluated) and economy (the dripping after dipping was evaluated). The data are presented in Table 4.

Table 4. Evaluation study of different experimental teat dip solutions *in vivo*.

Parameters	Experimental Formulas and the Results of the Evaluation of the Tested Parameters		
	Composition 1 (Hydroxypropyl Guar Gum 0.5%, Dye 0.02%)	Composition 2 (Hydroxypropyl Guar Gum 0.89%, Dye 0.05%)	Composition 3 (Hydroxypropyl Guar Gum 1.2%, Dye 0.12%)
Color			
Evaluation: (not visible—1, clearly visible—5)	3 points After dipping, the color is bright and lasts well for 10 min. After 60 min, the color did not change. After 12 h, the color disappeared.	5 points After dipping, the color is bright and lasts well for 10 min. After 60 min, the color did not change. After 12 h, the remains of the color are visible.	5 points After dipping, the color is bright and lasts well for 10 min. After 60 min, the color did not change. After 12 h, the remains of the color are visible.
Dripping immediately after dipping			
Evaluation: (intense dripping—1, no dripping—5)	1 point After dipping, the dripping is intense (about two minutes).	3 points After dipping, the dripping is moderate (3–4 drops in the first minute).	2 points After dipping, the dripping is intense (4–6 drops in the first minute).
Formation of a drop on the teat end			
Evaluation: (not properly formed—1, properly formed—5)	1 point The drop does not form; dripping is too intense.	4 points After a few minutes, a stable hanging drop is formed, which lasts for about 40 min. After 60 min, the hanging drop is no longer visible.	3 points After five minutes, an elongated drop is formed that does not fall off. After 60 min, the hanging drop is no longer visible.
Teat covered with a film			
Evaluation: (covered with a thick film—1, covered with a thin film—5)	3 points Covers with a thin film, which becomes even thinner and unstable due to heavy dripping.	5 points Covers the skin of the teat with an even film in an even layer.	2 points Covers with a thick film, high product yield.
Evenness of teat coverage			
Evaluation: (covers unevenly—1, covers evenly—5)	4 points Covers evenly enough	4 points Covers evenly enough	4 points Covers evenly enough
General evaluation of experimental formulations of the teat dip solution			
	12 points	21 points	16 points

During the study, it was found (Table 4) that the first experimental composition with a concentration of 0.5% thickener was insufficient, because immediately after dipping, the experimental product dripped intensively, covered the skin of the teat with a thin film, which was unstable due to heavy dripping, and did not form a drop at the end of the teat.

The third experimental composition of the new model of teat dip solution with a 1.2% amount of hydroxypropyl guar gum was not satisfactory (Table 4), because immediately after dipping, the experimental product dripped intensively and abundantly (4–6 drops per minute), the teat was covered with a too thick film, which resulted in a high yield of the product. The second experimental composition, when the hydroxypropyl guar gum concentration of 0.89% was used, which covered the teat with an even film, after a few minutes, a stable hanging drop was formed at the end of the teat, which did not fall off, and it lasted for about 40 min. The viscosity of the second EC was 1450–1500 mPa.s. All three experimental formulations used different amounts of dye, selected respectively, at

0.02–0.05–0.12%. After dipping, the color was clearly visible (red), and the color remained visible even after 50–60 min, but later, the intensity of the color remained practically unchanged in the second and third experimental compositions. So, depending on the dye concentration after 12 h, the color residues were visible only after using 0.05–0.12% of dye. After evaluating the data presented in Table 4, the optimal second experimental composition with a 0.89% amount of hydroxypropyl guar gum and 0.05% of dye was selected for further study.

In the second stage, stability studies of the optimal teat dip solution composition were carried out, i.e., the experiments were carried out in order to evaluate the possible changes in the composition's visual/sensual properties (color, odor and homogeneity), pH, and viscosity parameters. Three batches of the experimental composition of the modeled optimal composition were produced for the stability study.

The consistency of the modeled composition was homogeneous, the color remained bright red as its odor characteristic being retained, and all these properties did not change on the 6th and 12th months after production date (Table 5). During the follow-up period, after 24 months, this product changed visually, while delamination and turbidity of the modeled compositions were found during preliminary tests.

Table 5. Long-term stability test results.

Evaluation Period	Homogeneity	Color	Odor	pH	Viscosity, mPa.s
After 24 h	Homogeneous	Red	Characteristic mint essential oil	5.9 ± 0.18	1478 ± 18
After 6 months	Homogeneous	Red	Characteristic mint essential oil	5.9 ± 0.18	1460 ± 14
After 12 months	Homogeneous	Red	Characteristic mint essential oil	5.9 ± 0.18	1435 ± 15
After 24 months	Not homogeneous, dark precipitate observed	Red	Characteristic mint essential oil	5.2 ± 0.05	1420 ± 10

The results of the stability study showed that the pH value of the modeled teat dip solution remained stable in the long-term program, unchanged over 12 months (Table 5), while the pH of EC in the optimal composition was within 5.8–6.1 ($p > 0.05$). The pH was close between different batches and remained stable in the modeled product for 12 months ($p = 0.83$). The statistical data analysis showed that there were differences after 24 months, where the pH value was 5.2–5.3, but these were not significantly different ($p = 0.25$).

The viscosity readings of the modeled teat dip solution 24 h after production in different series of samples were, on average, within the limits of 1478 ± 18 mPa.s (Table 5), and no differences were found between the teat dip solutions series ($p > 0.05$). Viscosity readings during storage varied evenly, although they were not significantly different ($p = 0.72$), and the Pearson correlation coefficient was $r = 0.96$ – 0.99 . The long-term stability program determined the viscosity changes after 12 months (2.6% decrease) and 24 months (3.9%), but these were not significantly different ($p = 0.48$).

The color, homogeneity and odor remained unchanged during the accelerated stability program. After the centrifugation tests, the investigated products did not change, they remained stable during the entire test, and the product phases did not separate (Table 6).

Table 6. Results of the accelerated stability tests.

Evaluation Period	Homogeneity	Color	Odor	pH	Centrifugation, Speed 4500 rpm, Time 8 min
After manufacturing	Homogenic	Red	Characteristic mint essential oil	5.9 ± 0.2	Not layered, stable
Heating/cooling cycles	Homogenic	Red	Characteristic mint essential oil	5.9 ± 0.1	Not layered, stable
After 2 months	Homogenic	Red	Characteristic mint essential oil	5.9 ± 0.2	Not layered, stable

During storage of the samples for the new modeled teat dip solution at a +45 °C temperature for 2 months, no significant ($p = 0.75$) deviation in the pH value from the initial value was found (Table 6). Furthermore, it can be affirmed that the pH value of the samples remained constant during the heating/cooling cycles, and the readings exhibited stability ($p = 0.25$). The stressful experiment conditions did not cause a change between the batches, with the pH value remaining strongly correlated between the batches ($r = 0.96$ – 0.98).

The third task in evaluating the new modeled teat dip solution was to check its bactericidal, anti-yeast and antifungal activities. The test method described in the standard evaluated the effectiveness of the teat dip solution in order to reduce the number of viable microorganisms used in the test. The study showed that the 50% and 80% teat dip solution concentrations were bactericidally active against all the bacteria tested strains ($\log R > 5$, Table 7). After diluting the teat dip solution to 10%, it lost effectiveness. However, a 10% teat dip solution was effective against Gram-negative bacteria (*E. coli*). The 80% and 50% teat dip solution concentrations inhibited the growth of reference *Candida albicans* yeast strains, whereas the 10% teat dip solution had no anti-yeast effect. The results are presented in Table 7.

Table 7. Teat dip solutions containing chlorhexidine (80%, 50%, 10%) antimicrobial activity (log R) according to the UNI EN 1656 and UNI EN 1657 standards.

Test Microorganisms	Test Suspension	Results		
		80%	50%	10%
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶ ; >330->330 * 10 ⁻⁷ ; 39–42 * N: 4.05 × 10 ⁸ N ₀ : 4.05 × 10 ⁷ log N ₀ : 7.61	Active log R > 5.46 V _c : <14–<14 N _a < 140 log N _a < 2.15	Active log R > 5.46 V _c : <14–<14 N _a < 140 log N _a < 2.15	Not active log R = 4.35 V _c : 189–171 N _a = 1800 log N _a = 3.26
<i>S. uberis</i> ATCC 19436	10 ⁻⁶ ; >330->330 * 10 ⁻⁷ ; 38–48 * N: 4.30 × 10 ⁸ N ₀ : 4.30 × 10 ⁷ log N ₀ : 7.63	Active log R > 5.48 V _c : <14–<14 N _a < 140 log N _a < 2.15	Active log R > 5.48 V _c : <14–<14 N _a < 140 log N _a < 2.15	Not active log R < 4.11 V _c : >330->330 N _a > 3300 log N _a > 3.52
<i>E. coli</i> ATCC 10536	10 ⁻⁶ ; >330->330 * 10 ⁻⁷ ; 42–46 * N: 4.40 × 10 ⁸ N ₀ : 4.40 × 10 ⁷ log N ₀ : 7.67	Active log R > 5.49 V _c : <14–<14 N _a < 140 log N _a < 2.15	Active log R > 5.49 V _c : <14–<14 N _a < 140 log N _a < 2.15	Active log R > 5.44 V _c : 18–<14 N _a < 160 log N _a < 2.2
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10 ⁻⁵ ; >330->330 * 10 ⁻⁶ ; 38–44 * N: 4.10 × 10 ⁷ N ₀ : 4.10 × 10 ⁶ log N ₀ : 6.61	Active log R > 4.46 V _c : <14–<14 N _a < 140 log N _a < 2.15	Active log R > 4.46 V _c : <14–<14 N _a < 140 log N _a < 2.15	Not active log R < 3.09 V _c : >330->330 N _a > 3300 log N _a > 3.52
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	10 ⁻⁵ ; >165->165 * 10 ⁻⁶ ; 28–32 * N: 3.00 × 10 ⁷ N ₀ : 3.00 × 10 ⁸ log N ₀ : 6.48	Not active log R < 3.26 V _c : >165->165 N _a > 1650 log N _a > 3.22	Not active log R < 3.26 V _c : >165->165 N _a > 1650 log N _a > 3.22	Not active log R < 3.26 V _c : >165->165 N _a > 1650 log N _a > 3.22

PS.—N₀ = number of CFU/mL in the test mixture; R = reduction in viability; N_a = number of CFU/mL of the test mixture; V_c = viable count; N = number of CFU/mL of the test suspension; * = number of colonies (CFU) in test suspension dilutions.

4. Discussion

During the development of the teat dip solution, the first task was to model a product that would properly cover the skin of the teat, would last for the required time and would properly color the skin of the teat after dipping.

Following the identification of the suitable hydroxypropyl guar thickener (guar gum), CI 16255 dye and chlorhexidine digluconate concentrations, a new teat dip solution was created that also contained glycerol, polysorbate 80, isopropyl alcohol, *Mentha arvensis* herb oil and *Aesculus hippocastanum* dry extract. The teat dip solution was modulated for post-milk udder hygiene with a viscosity of 1478 ± 18 mPa.s. When such a viscosity is introduced for in vivo investigation, the product spread quickly on the skin and achieved the desired consistency, forming the drop at the end of the teat, dying the skin of the teat and holding the consistency during the storage period. The 5.9 ± 0.18 pH of the solution was very close to natural pH for the teat skin. While modeling the product, the main ingredients provided viscosity, color and the antimicrobial effect, while the other ingredients performed technological and auxiliary roles.

In biocidal teat dip solutions, the most important parameters are the disinfecting effect and sufficient viscosity. Product viscosity is an important physical parameter that reflects product quality [17,18]. Therefore, we paid great attention to obtaining the suitable viscosity in our study. As other researchers indicate, guar gum performs the role not only of a thickener but also forms a protective film, performs an emulsifying effect and stabilizes the product during development [17]. While evaluating the literature data, it was found that the amount of guar gum used in the product formulations varies from 0.1 to 0.3% [19]. We have used the hydroxypropyl guar polymer, C₃H₈O₂ x (isomer), which is a purified non-ionic derivative of guar gum. It works as an excellent thickener in cosmetic formulations containing a high polar solvent content. It also works as an O/W emulsion stabilizer and is particularly useful in stabilizing emulsions containing alcohol [20]. Thanks to its polymeric structure, this guar derivative is compatible with the skin, leaving a soft feeling after application [19]. During the research, we chose hydroxypropyl guar gum, which forms the viscosity of the new product. Hydroxypropyl guar gum is sufficient in the product at 0.89%. This thickener concentration kept the formulated product stable statistically reliably throughout the study period, i.e., monitoring for 1 year after manufacture. If it is stored for a longer period (after 24 months), the viscosity reduces, the product changes its visual appearance and the pH reduces to 5.2 ± 0.05 .

Developing new products, it is very important that products are not hazardous to animals, human health or the environment. Therefore, attention was drawn to the classification of thickener and antimicrobial substance according to EU legislation [21]. The classification of the chemical mixture is a particularly important factor in teat dip solutions. According to EU legislation, the hydroxypropyl guar gum polymer in our product does not pose a risk to animal health or the environment. In addition, the chlorhexidine withdrawal period is not applied for the dairy animals.

While modeling the product, a red dye was selected, the concentration of which in the product met the raised requirements; the color remained bright and stable until the next milking, and its optimal concentration in the modeled product was 0.05%.

As Kumar et al. (2014) [22] indicate, the selection of auxiliary materials is important for the production of local effect products. Each ingredient has its function in the product. The proper selection of the excipients can effectively form stable systems. Auxiliary substances used as supplements in the product also protected and preserved the skin of the teat. It is indicated in the literature that glycerol moisturizes the stratum corneum of the skin, increases elasticity, protects against external irritants and improves wound healing. There is indicative data that glycerol can also have an antimicrobial effect [23,24]. Plant extracts are widely used in the world and are of great importance not only for human health but also animal health [25]. In dairy farming, it is important that phytotherapeutic preparations have no side effects, no shelf life and do not cause bacterial resistance. The mint essential oil was chosen for our products, as it has a specific deodorizing odor and ensures a cooling,

stimulating, warming and refreshing effect [26]. It interacts with cold-sensitive TRPM8 receptors in the skin, which are responsible for sensing the cooling effect [27]. Menthol has antiseptic, antiviral features that stop the growth of microorganisms and fungi [28]. Another herbal preparation that we have used is chestnut extract. According to the researchers, horse chestnut extract improves skin elasticity, helps with skin diseases and, in addition, β -escin determines the anti-edematous and vasoprotective effect of horse chestnut fruits, which inhibits inflammation, reduces swelling and relieves pain [29,30].

While modeling our product, isopropanol and polysorbate 20 were chosen as technological materials which mix well with other ingredients. This feature of isopropyl alcohol allows it to be used for dissolving many organic compounds, and it is frequently used as a solvent in pharmaceuticals and cosmetics. This alcohol is also used as a disinfectant because it prevents the proliferation and growth of microorganisms [31]. Technological substances, such as citric acid and sodium hydroxide, allowed us to model the required pH of the product, which is close to the natural pH of cattle skin. It is important to ensure the correct pH so that the product would not irritate the skin. Therefore, this optimally formulated moisturizer has the right pH to moisturize the skin of the teat.

When evaluating the quality of biocidal products, the stability studies of physical and chemical parameters are important. The testing of stability indicates the quality sufficiency of manufactured products throughout the shelf life and the product's retaining of its original chemical and physical properties. If the product is unstable, its active substances can change, and the product itself can lose its disinfecting characteristics. When the viscosity in the teat dipping solution is reduced, no film is formed on the teat, which would ensure the disinfectant properties while retaining the active substances at the destination area.

Chang R.K. and colleagues, in an article dating back to 2013 [32], indicated the recommended tests for products which are intended to be used on the skin and which can be useful in assessing the quality of products (testing of organoleptic features, assessing visual homogeneity, determining pH, assessing product consistency etc.). Most of these tests are not regulated as mandatory but are recommended to verify and confirm the quality of the modeled product. To register a biocidal product in the European Union, it is imperative to provide the findings of stability studies, which determine the shelf life of the product [18]. We evaluated the parameters defining the stability of the developed products in long-term and accelerated stability programs. The product's physical integrity, stability and chemical stability were tested. After evaluating the test results, it was found that the teat dip was stable at low, high and room temperatures. The viscosity and pH results of the samples were also within the initial limits ($p > 0.05$), i.e., stable. The results of the study show that the change in storage conditions does not have a significant impact on the physical and chemical properties of the newly developed teat dipping solution as well as the product's appearance and organoleptic properties.

A disinfectant is a necessary component in udder hygiene, and we have chosen chlorhexidine. This substance is one of the most widely used biocides in veterinary and animal husbandry. Chlorhexidine is a clinically important antiseptic, disinfectant and preservative. It is a potent membrane-active agent against bacteria, and it inhibits outgrowth but not the germination of bacterial spores, although it is not sporicidal. It shows a high activity against wild-type and outer membrane mutants of *E. coli* [33]. Chlorhexidine digluconate (CHX) has been known as an antiseptic since the early 1950s for clinical use. It is widely used in medicine and veterinary as a broad-spectrum antimicrobial substance that destroys cell membranes. Vianna et al. [34] demonstrated the antimicrobial efficacy of CHD in a study. Analyzing in vitro the antimicrobial activity of different CHD concentrations (0.2%, 1% and 2%) against pathogens, it was found that 2% CHD (in gel or solution form) was bactericidal active against *S. aureus* and *C. albicans* in 15 s of exposure; meanwhile, the bactericidal effect on the *E. faecalis* culture was fixed within 1 min. Also, Gilbert, Moore (2005) [35] and Brookes et al. (2020) [36] additionally extended the analysis of the antimicrobial activity of CHD and found out that the antifungal effect of CHX is also related to the prevention of biofilm formation: it is not only destined to damage the microbial structure

or the cell membrane. This has been proven in studies with *C. albicans* cultures. Evans et al. (2009) [37] and Babickaite et al. (2016) [38] were investigating the CHX soak and gel in different concentrations. They pointed out that for the expected result, the appropriate chlorhexidine concentration and contact time are the most important factors.

In the research carried out by Riffon et al. (2001) [39] and Fitzpatrick et al. (2021) [40], it was indicated that within the European Union member states, there must be a common standard to evaluate teat disinfectant products. This European standard (EN), which is known as BS EN 1656, can be used to compare a range of disinfectants. We conducted a study under these standards with a modeled product as well. Our newly developed teat dip solution demonstrated a bactericidal effect. It was confirmed by an in vitro study against reference microbial isolates. Our research, according to the BS EN 165601:2019 or BS EN 1657:2016 standards, showed a bactericidal activity at 80% and 50% concentration to Gram-positive, Gram-negative bacteria and *C. albicans*.

Although the antifungal effect was not detected in the developed teat dip solution, it could be treated as a promising tool for the prevention of cow udder infections, which is known to be caused by multiple species of bacteria and only in some cases by fungi.

5. Conclusions

The modeled product has a homogeneous appearance, a red color and a specific odor of mint essential oil and lasted for the required time; after dipping, it properly covered the skin of the teats, had the desired consistency, did not drip and formed a drop at the end of the teat.

The desired features of the product were modeled using a chlorhexidine digluconate 20% solution of 2.5 g, the viscosity-forming polymer hydroxypropyl guar gum (0.89%) and the dye (CI 162551) (0.05 g). Product viscosity was 1450–1500 mPa.s, and the pH value was 5.8–6.1.

The quality of the modeled product did not change for 12 months in the long-term stability program: the consistency was homogeneous, the color remained bright, the odor was characteristic of the product and the pH value was stable. Difficult experimental conditions did not have a statistically significant effect on the pH value: the pH value of the modeled product fluctuated within stable product-specific limits.

Both 80% and 50% concentrations of the simulated teat dip solution inhibited the growth of *S. aureus*, *S. uberis*, *E. coli* and *C. albicans* strains. *Aspergillus niger* was not susceptible to the tested product; therefore, improved formulas for the teat protection from the pathogens should be explored further.

Author Contributions: Conceptualization, M.K. and R.M.; methodology, R.Š.; software, M.V.; validation, M.R.; data curation, I.K., M.K. and R.Š.; writing—original draft preparation, I.K. and M.K.; writing—review and editing, M.K., L.M. and M.R.; supervision, R.M. and Ž.Š.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the State Food and veterinary Service, approval number G2-227 issued on November 2022.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from the animal's owner.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We are thankful to Ramūnas Antanaitis for consultation and support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Williamson, J.H.; Lacy-Hulbert, S.J. Effect of disinfecting teats post-milking or pre-and post-milking on intramammary infection and somatic cell count. *N. Z. Vet. J.* **2013**, *61*, 262–268. [CrossRef]
2. Breen, J. The importance of teat disinfection in mastitis control. *Livestock* **2019**, *24*, 3. [CrossRef]
3. Ohnstad, I. Preventing mastitis infection through teat disinfection. *Livestock* **2015**, *20*, 214. [CrossRef]
4. Sudhan, N.A.; Sharma, N. Mastitis: An important production disease of dairy animals. *Farm Management and Diseases*. In *Ghaziabad: SMVS' Dairy Year Book; SMVS' (Serva Manav Vikas Samiti): Ghaziabad, India*, 2010; pp. 72–88.
5. Mišeikienė, R.; Rudejėvienė, J.; Gerulis, G. Effect of pre-milking antiseptic treatment on the bacterial contamination of cow teats' skin. *Bulg. J. Vet. Med.* **2015**, *18*, 159–166. [CrossRef]
6. Garvey, M.; Curran, D.; Savage, M. Efficacy testing of teat dip solutions used as disinfectants for the dairy industry: Antimicrobial properties. *Int. J. Dairy Technol.* **2017**, *70*, 179–187. [CrossRef]
7. Fitzpatrick, S.R.; Garvey, M.; Jordan, K.; Flynn, J.; O'Brien, B.; Gleeson, D. Screening commercial teat disinfectants against bacteria isolated from bovine milk using disk diffusion. *Vet. World* **2019**, *12*, 629–637. [CrossRef]
8. Chotigarpa, R.; Lampang, N.K. Antiseptic effect of natural teat dip containing lactic acid against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Vet. World* **2019**, *12*, 397–401. [CrossRef]
9. Kybartas, M.; Siugzdiniene, R.; Virgailis, M.; Mockeliūnas, R. A Study of Stability and Antimicrobial Efficacy of a New Model Teat Dip Solution Containing Lactic Acid. *Vet. Ir Zootech.* **2022**, *80*, 53–60.
10. Cieplik, F.; Jakubovics, N.S.; Buchalla, W.; Maisch, T.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A. Resistance toward Chlorhexidine in Oral Bacteria—Is There Cause for Concern? *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 587. [CrossRef]
11. Alves, F.R.; Morsink, M.; Batai, F.; Chaud, M.V.; Almeida, T.; Fernandes, D.A.; da Silva, C.F.; Souto, E.B.; Severino, P. Applications of Natural, Semi-Synthetic, and Synthetic Polymers in Cosmetic Formulations. *Cosmetics* **2020**, *7*, 75. [CrossRef]
12. Elella, M.H.A.; Goda, E.S.; Adly Gab-Allah, M.; Hong, S.E.; Pandit, B.; Lee, S.; Gamal, H.; ur Rehman, A.; Yoon, K.R. Xanthan gum-derived materials for applications in environment and ecofriendly materials: A review. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 104702. [CrossRef]
13. Colipa Guidelines "Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products". 2004. Available online: <http://www.packagingconsultancy.com/pdf/cosmeticscolipa-testing-guidelines.pdf> (accessed on 15 January 2023).
14. Magari, R.T. Assessing Shelf Life Using Real-Time and Accelerated Stability Tests. *BioPharm Int.* **2003**, *16*, 36–48.
15. Council of Europe. *European Pharmacopoeia*, 8th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2013; Volume 1, pp. 24–25, 28–30, 123, 807–809.
16. Available online: https://www.en-standard.eu/bs-en-1656-2019-chemical-disinfectants-and-antiseptics-quantitative-suspension-test-for-the-evaluation-of-bactericidal-activity-of-chemical-disinfectants-and-antiseptics-used-in-the-veterinary-area-test-method-and-requirements-phase-2-step-1/?gclid=CjwKCAjw0N6hBhAUeIwAXab-TXYK9jBMc75jAnT5a1YRqsDyTvwp1ZymGwv5f5fWEj1WsITZGDXYRoCh4sQAvD_BwE (accessed on 10 January 2023).
17. Petri, D.F.S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *13*. [CrossRef]
18. Regulation (EU) of the European Parliament and Council no. 528/2012, Title 2 of Annex III. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32012R0528> (accessed on 27 January 2023).
19. Haghi, A.K.; Pogliano, L.; Ribeiro, F.C.A. *Physical Chemistry for Chemists and Chemical Engineers. Multidisciplinary Research Perspectives*; Apple Academic Press Inc.: Burlington, ON, Canada; p. 380. 2018; Available online: https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=8QhpDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT10&dq=Haghi,+A.K.%3B+Ribeiro,+F.C.A.%3B+et+al.+Appl.+Chem.+Chem.+Eng.+2018&ots=KnmTvqv38C&sig=PICrqGNIPjUNJldIjXeGB7uVvow&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (accessed on 22 January 2023).
20. Technical Bulletin of Esaflor HDR. Available online: <http://www.nardev.com/UploadSection/ProdCat-688-1450931384.pdf> (accessed on 27 January 2023).
21. European Parliament and Council Regulation (EC) No. 1272/2008. Available online: <https://www.ecolex.org/details/legislation/regulation-ec-no-12722008-of-the-european-parliament-and-of-the-council-on-classification-labelling-and-packaging-of-substances-and-mixtures-amending-and-repealing-directives-67548eec-and-199945ec-and-amending-regulation-ec-no-19072006-lex-faoc089390/> (accessed on 3 March 2023).
22. Kumar, A.; Kushwaha, V.; Sharma, P.K. Pharmaceutical microemulsion: Formulation, characterization and drug deliveries across skin. *Int. J. Drug Dev. Res.* **2014**, *6*, 1–21. Available online: https://www.researchgate.net/publication/285026890_Pharmaceutical_Microemulsion_Formulation_Characterization_and_Drug_deliveries_across_skin (accessed on 5 February 2023).
23. Rowe, R.C.; Sheskey, P.J.; Cook, W.G.; Fenton, M.E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 7th ed.; Pharmaceutical Press Avenue: London, UK; American Pharmacists Association: Washington, DC, USA, 2012; Volume 945, Available online: <http://www.gmpua.com/RD/RD/HandbookPharmaceutical%20Excipients.pdf> (accessed on 18 February 2023).
24. Fluhr, J.W.; Darlenski, R.; Surber, C. Glycerol and the skin: Holistic approach to its origin and functions. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 23–34. [CrossRef]
25. The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. *Escop, European Scientific Cooperative on Phytotherapy*; Thieme: New York, NY, USA, 2003; Volume 556.

26. Alankar, S. A review on peppermint oil. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2009**, *2*, 27–33. Available online: https://www.researchgate.net/publication/237842903_A_REVIEW_ON_PEPPERMINT_OIL (accessed on 3 March 2023).
27. Mehta, N.J.; Patadiya, N.D.; Patel, J.; Shastri, D.H.; Shelat, P.K. Development and evaluation of antiarthritic herbal ointment. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **2013**, *4*, 221–228. Available online: https://www.researchgate.net/publication/287089078_Development_and_evaluation_of_antiarthritic_herbal_ointment (accessed on 12 March 2023).
28. Galeotti, N.; Ghelardini, C.; Di, L.; Mannelli, C.; Mazzanti, G.; Baghiroli, L. Menthol is present in the volatile oil of several species of mint plants such as peppermint. *Planta Med.* **2001**, *67*, 174–176. [CrossRef]
29. Persson, I.A.L.; Persson, K. Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). *Recent Prog. Med. Plants* **2010**, *28*, 159–171.
30. Pekal, A.; Pyrzynska, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 1776–1782. [CrossRef]
31. Šaltenienė, R. Rankų Higiena. Slauga 2017 geguže.indd. Available online: <https://www.zumalai.vu.lt/slauga/article/view/19472/18607> (accessed on 12 February 2023).
32. Chang, R.K.; Raw, A.; Lionberger, R.; Yu, L. Generic development of topical dermatologic products: Formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. *AAPS J.* **2013**, *15*, 41–52. [CrossRef]
33. Russell, A.D. Chlorhexidine: Antibacterial action and bacterial resistance. *Infection* **1986**, *14*, 212–215. [CrossRef] [PubMed]
34. Vianna, M.E.; Gomes, B.P.; Berber, V.B.; Zaia, A.A.; Ferraz, C.C.; de Souza-Filho, F.J. In Vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2004**, *97*, 79–84. [CrossRef]
35. Gilbert, P.; Moore, L. Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 703–715. [CrossRef]
36. Brookes, Z.L.S.; Bescos, R.; Belfield, L.A.; Ali, K.; Roberts, A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: A narrative review. *J. Dent.* **2020**, *103*, 103497. [CrossRef]
37. Evans, L.K.M.; Knowles, T.G.; Werret, G.T.; Holt, P.E. The efficacy of chlorhexidine gluconate in canine skin preparation - practice survey and clinical trials. *J. Small Anim. Pract.* **2009**, *50*, 458–465. [CrossRef] [PubMed]
38. Babickaite, L.; Ramanauskiene, K.; Grigonis, A.; Ivaskiene, M.; Daunoras, G.; Klimiene, I.; Virgailis, M.; Zamokas, G.; Inkeniene, A.M.; Matusevicius, A.P. Determination of antimicrobial activity of chlorhexidine gel. *Acta Pol. Pharm.* **2016**, *73*, 1623–1630.
39. Rifon, R.; Sayasith, K.; Khalil, H.; Dubreuil, P.; Drolet, M.; Lagacé, J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 2584–2589. [CrossRef] [PubMed]
40. Fitzpatrick, S.R.; Garvey, M.; Flynn, J.; O'Brien, B.; Gleeson, D. The effect of disinfectant ingredients on teat skin bacteria associated with mastitis in Irish dairy herds. *Irish Vet. J.* **2021**, *74*, 1. Available online: <https://irishvetjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13620-020-00179-7> (accessed on 10 February 2023). [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

PRIEDAI

Ekspirimentinių spenių vilgiklių su pieno rūgštimi sudėty (100 g produkto)

Produkto sudėtis	CAS registracijos Nr.	Molekulinė masė	Gamintojas	Kiekis, g	Paskirtis
L-(+)-pieno rūgštis, C ₃ H ₆ O ₃ , taip pat žinoma kaip L-(+)-2-hidroksipropano rūgštis (80 proc.)	79-33-4	M = 90 g/mol	Purac Biochem, Nyderlandai	6,30	Veikioji medžiaga (antimikrobinės savybės), pH reguliatorius
Ksantano lipai, C ₃₅ H ₄₉ O ₂₉ (monomeras)	11138-66-2	M = 181,21 g/mol	CP Kelco France, Prancūzija	PR-1 0,50 PR-2 0,67 PR-3 0,85	Stabilizatorius, tirštiklis, klampumo modifikatorius
Dažiklis CI 15985, dinatrio 6-hidroksi-5-[(4-sulfonatofenil)azo]naftalen-2-sulfonatas	2783-94-0	M = 452,37 g/mol	Neelikon Food Dyes & Chemicals Ltd, Indija	PR-1 0,01 PR-2 0,03 PR-3 0,05	Dažiklis
Vaisinių medetkų ekstraktas, sausas (angl. <i>Calendula officinalis dry extract</i>), (Ekstrakto santykis 5:1) (Ekstrahavimo tirpiklis: etanolis / vanduo (40/60 V/V))	84776-23-8	Ekstraktas yra įvairių medžiagų mišinys *	Gonmisol, Ispanija	0,03	Antioksidantas, kondicionierius
Sejamųjų avių ekstraktas, sausas (angl. <i>Avena sativa dry extract</i>), (Ekstrakto santykis 4:1) (Ekstrahavimo tirpiklis: vanduo)	84012-26-0	Ekstraktas yra įvairių medžiagų mišinys *	nVH Italia srl, Italija	0,02	Antioksidantas, kondicionierius
Glicerolis (1,2,3-propantrilis), C ₃ H ₅ (OH) ₃	56-81-5	M = 92,09 g/mol	Aarhus Karshams Sweden AB, Švedija	9,00	Odos minkštiklis, drėkiklis
Sorbitolis, H(CHOH) ₆ H	50-70-4	M = 182,17 g/mol	Aarhus Karshams Sweden AB, Švedija	1,00	Odos minkštiklis, drėkiklis
Išgrynintas vanduo, H ₂ O	7732-18-5	M = 18,01 g/mol	UAB Ruvera, Lietuva	Iki 100 g	Tirpiklis

Pastaba: * molekulinė masė nespecifikuojama.

Ekspimentinių spenių vilgiklių su jodo povidonu sudėtys (100 g produkto)

Produkto sudėtis	CAS registracijos Nr.	Molekulinė masė	Gamintojas	Kiekis, g	Paskirtis
Jodo povidonas, C ₆ H ₉ I ₂ NO, taip pat žinomas kaip polivinilpirolidonijodas	25655-41-8	M = 364,95 g/mol	Ashland Services BV, Nyderlandai	2,36 (aktyvaus jodo 2500 ppm)	Veikloji medžiaga (antimikrobinės savybės)
Ksantano lipai, C ₃₅ H ₄₉ O ₂₉ (monomeras)	11138-66-2	M = 181,21 g/mol	CP Kelco France, Prancūzija	JP-1 0,50 JP-2 0,67 JP-3 0,85	Stabilizatorius, tirštiklis, klampumo modifikatorius
Vaisinių ramunėlių ekstraktas, sausas (angl. <i>Chamomilla flower dry extract</i>), (Ekstrakto santykis 4:1) (Ekstrahavimo tirpiklis: vanduo)	84082-60-0	Ekstraktas yra įvairių medžiagų mišinys *	nVH Italia srl, Italija	0,05	Antioksidantas, kondicionierius
Glicerolis (1,2,3-propantriolis), C ₃ H ₅ (OH) ₃	56-81-5	M = 92,09 g/mol	Aarhus Karshams Sweden AB, Švedija	5,00	Odos minkštiklis, drėkiklis
Sorbitolis, H(CHOH) ₆ H	50-70-4	M = 182,17 g/mol	Aarhus Karshams Sweden AB, Švedija	1,00	Odos minkštiklis, drėkiklis
Išgrynintas vanduo, H ₂ O	7732-18-5	M = 18,01 g/mol	UAB Ruvera, Lietuva	Iki 100 g	Tirpiklis

Pastaba: * molekulinė masė nspecifikuojama.

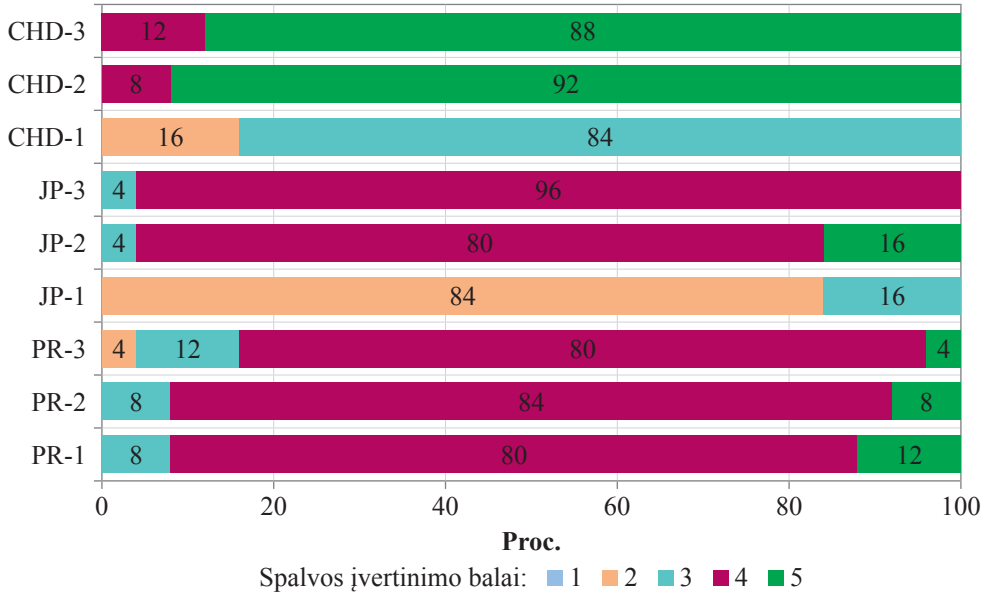
Ekspertimentinių spenių vilgiklių su chlorheksidino digliukonatu sudėtys (100 g produkto)

Produkto sudėtis	CAS registracijos Nr.	Molekulinė masė	Gamintojas	Kiekis, g	Paskirtis
Chlorheksidino digliukonatas 20 proc. (D-gliukono rūgšties ir N,N'-bis(4-chlorfenil)-3,12-dimino-2,4,1,1,1,3-tetraazatetradekandiamidino junginys (2:1)) $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \times 2C_6H_{12}O_7$	18472-51-0	M = 897,77 g/mol	Medichem, S.A., Ispanija	2,50	Veiklioji medžiaga (antimikrobinės savybės)
Hidroksiipropilo guaras derva (lipai), $C_3H_8O_2 \times$ (izomeras)	39421-75-5	M = 536,44 g/mol	Lamberti SpA, Italija	CHD-1 0,50 CHD-2 0,89 CHD-3 1,20	Stabilizatorius, tirštiklis, klampumo modifikatorius
Dažiklis CI 16255 (trinatrio 1-(1-naftilazo)-2-hidroksinaftalen-4',6,8-trisulfonatas) $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	2611-82-7	M = 604,46 g/mol	Neelikon Food Dyes & Chemicals Ltd, Indija	CHD-1 0,02 CHD-2 0,05 CHD-3 0,12	Dažiklis
Glicerolis (1,2,3- propantriolis), $C_3H_5(OH)_3$	56-81-5	M = 92,09 g/mol	Aarhus Karshams Sweden AB, Švedija	5,10	Odos minkštiklis, drėkiklis
Mėtų eterinis aliejus (angl. <i>Mentha arvensis herb oil</i>) (L-Mentolas \geq 35,0 proc., Mentonas (17,0–25,0 proc., Cineolis \leq 1,0 proc., Izomentonas \geq 13,0 proc., Metilo acetatas 2,0–6,0 proc.)	90063-97-1	Aliejus yra įvairių medžiagų mišinys*	Düllberg Konzentra GmbH & Co. KG, Vokietija	0,10	Antiseptikas, kvapiklis, vėsos pojūtį sukelianti medžiaga
Kaštonų ekstraktas iš sėklų (angl. <i>Aesculus hippocastanum dry extract from seeds</i>) (Aescinas 18,0–22,0 proc.) (Ekstrakto santykis 7:1) (Ekstrahavimo tirpiklis: etanolis / vanduo (40/60 V/V))	8053-39-2	Ekstraktas yra įvairių medžiagų mišinys *	Dorana Nature, Slovakija	0,01	Antioksidantas, kondicionierius

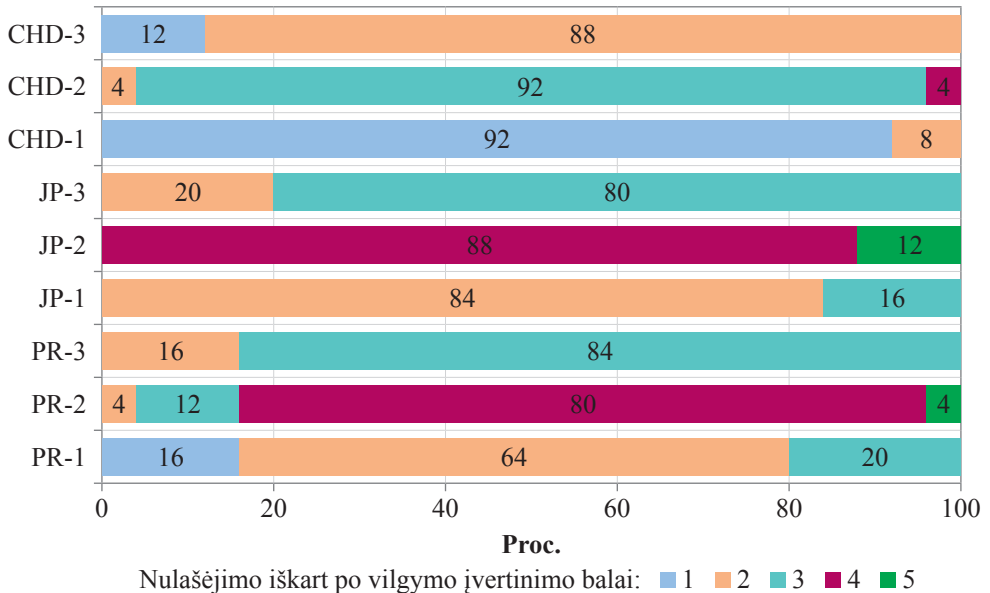
Produkto sudėtis	CAS, registracijos Nr.	Molekulinė masė	Gamintojas	Kiekis, g	Paskirtis
Polisorbatas 80, C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	9005-65-6	M = 1310,00 g/mol	Oleon NV, Belgija	3,00	Emulsiklis
Izopropilo alkoholis, C ₃ H ₇ OH	67-63-0	M = 60,10 g/mol	Rebain, International NL, Nyderlandai	5,00	Tirpiklis
Natrio hidroksidas, NaOH	1310-72-2	M = 92,09 g/mol	Stanchem Sp. z o.o., Lenkija	q.s.	pH regulatorius
Citrinos rūgštis, monohidratas, C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	5949-29-1	M = 210,14 g/mol	Reachem s.r.o., Slovackia	q.s.	pH regulatorius
Išgrynintas vanduo, H ₂ O	7732-18-5	M = 18,01 g/mol	UAB Ruvera, Lietuva	Iki 100 g	Tirpiklis

Pastaba: * molekulinės masės nespecifikuojama.

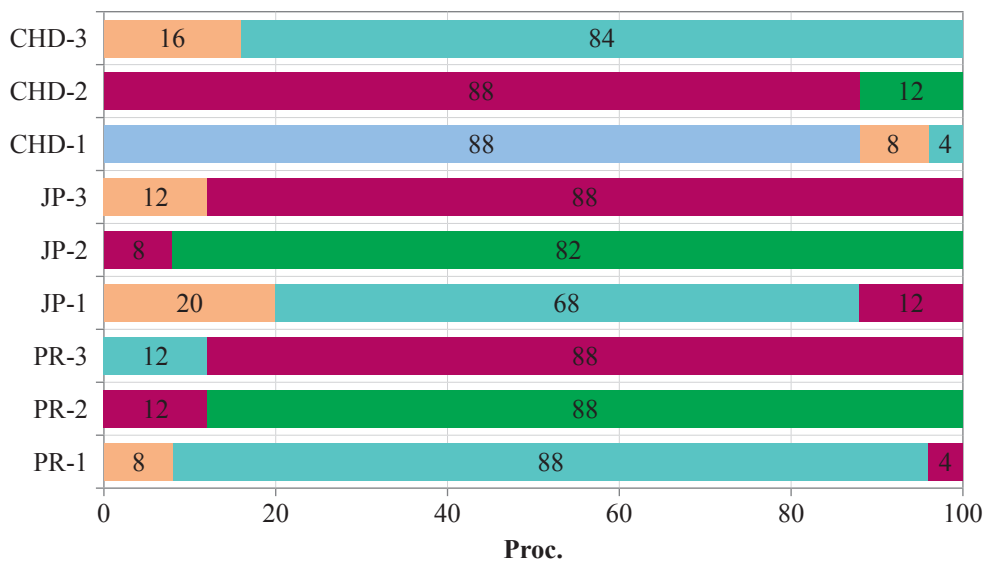
EK *in vivo* tyrimo rezultatai (pasiskirstymas pagal balus)



3.2.5 pav. Pasiskirstymas pagal spalvos įvertinimo balus
 $(\chi^2 = 412,7; lls = 24; p < 0,001)$

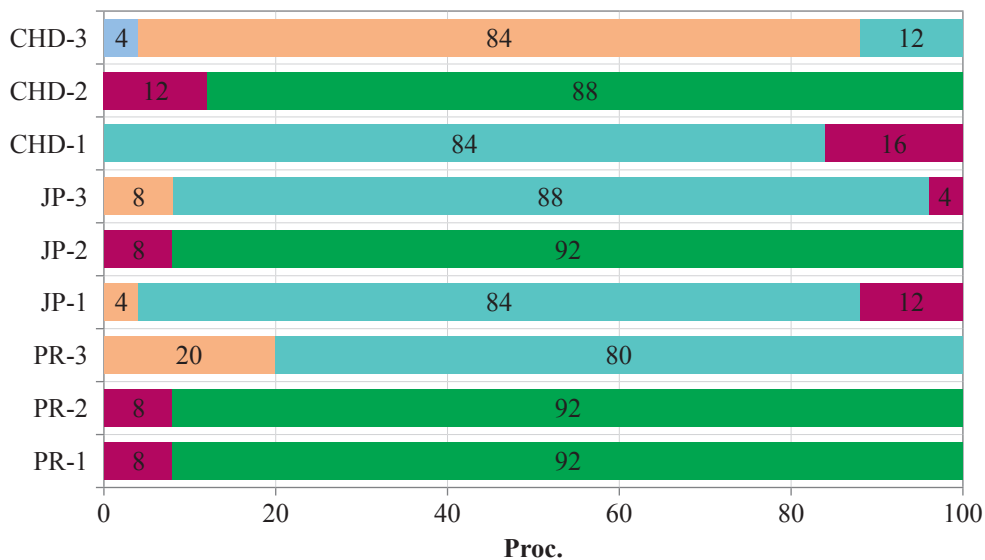


3.2.6 pav. Pasiskirstymas nulašėjimo iš kart po vilgymo įvertinimo balus
 $(\chi^2 = 470,6; lls = 32; p < 0,001)$



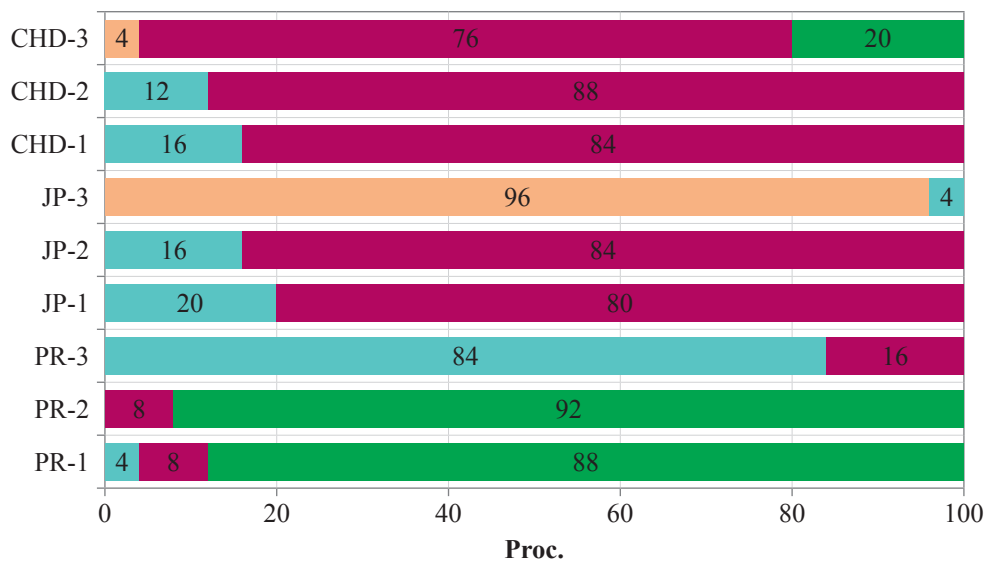
Lašo susidarymo ant spenio galo įvertinimo balai: 1 2 3 4 5

3.2.7 pav. Pasiskirstymas lašo susidarymo ant spenio galo įvertinimo balus ($\chi^2 = 546,4$; lls = 32; $p < 0,001$)



Spenio padengimo plėvele įvertinimo balai: 1 2 3 4 5

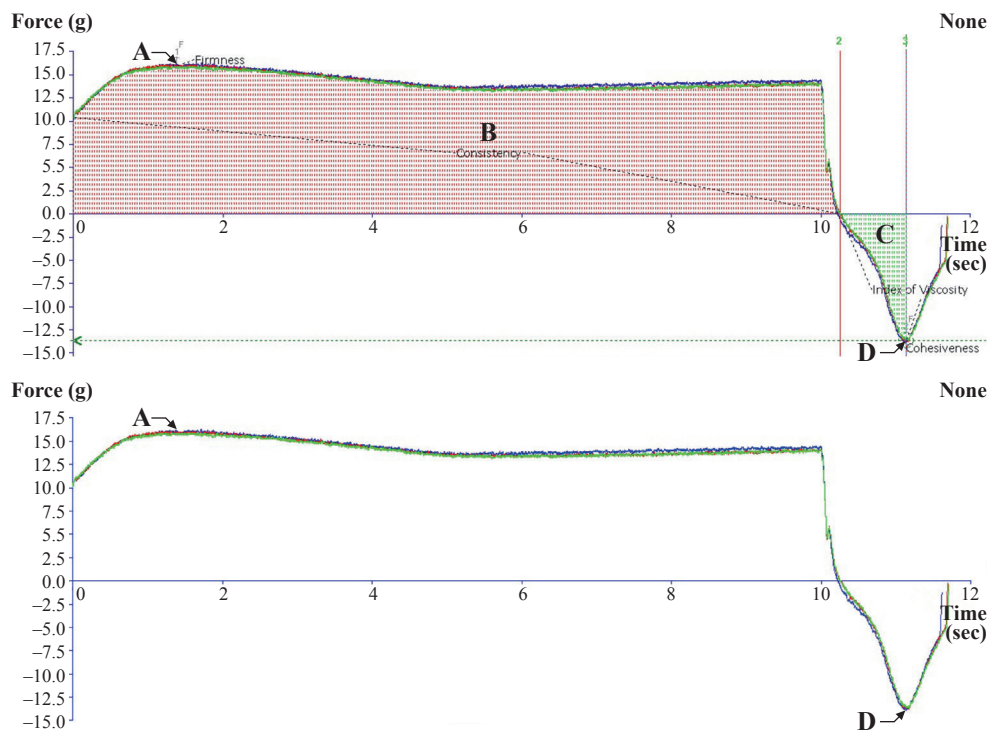
3.2.8 pav. Pasiskirstymas pagal spenio padengimo plėvele įvertinimo balus ($\chi^2 = 343,5$; lls = 32; $p < 0,001$)



Spenio padengimo tolygumo įvertinimo balai: 1 2 3 4 5

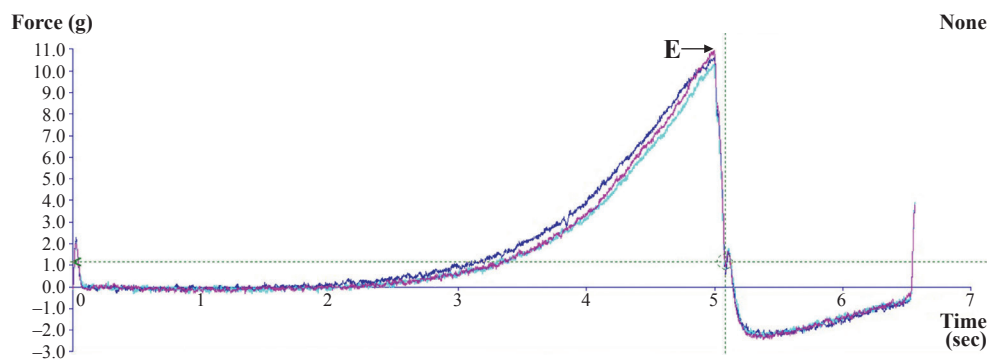
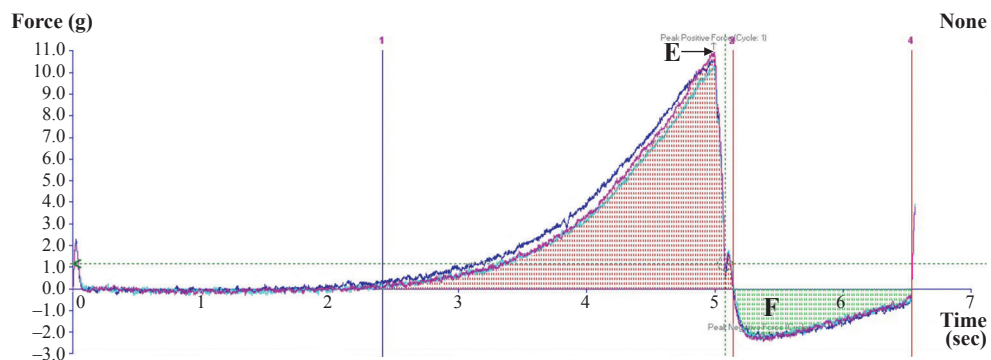
3.2.9 pav. Pasiskirstymas pagal spenio padengimo tolygumo įvertinimo balus ($\chi^2 = 461,4$; $lls = 24$; $p < 0,001$)

EK mėginių atgalinio išstūmimo testo grafinė išraiška

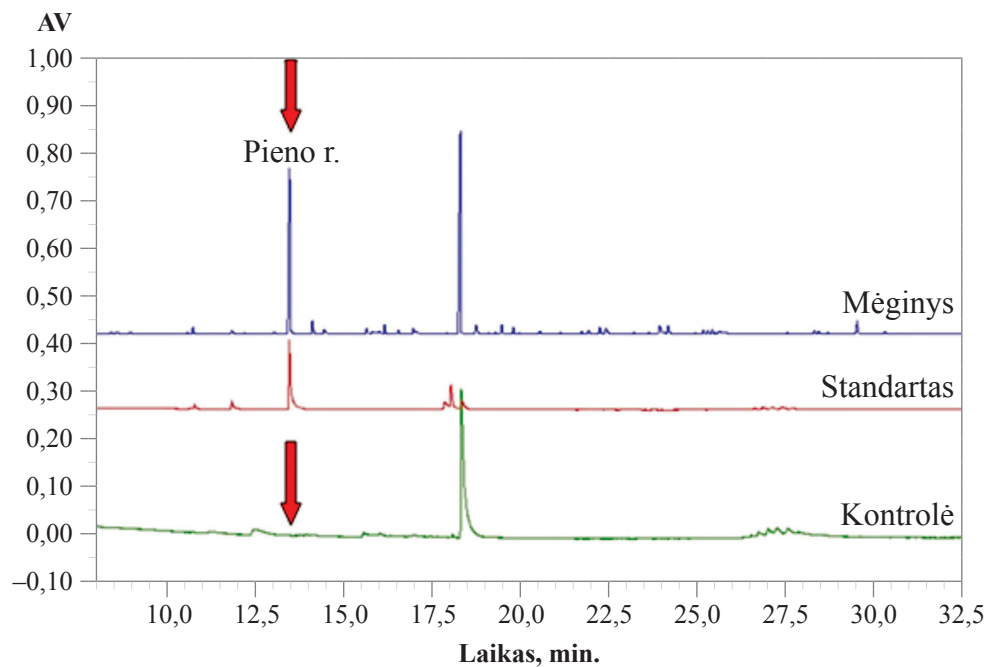


A – kietumas (teigiamos kreivės maksimumas), g; B – konsistencija (plotas po teigiama kreive), $g \times s$; C – klampos indeksas (plotas virš neigiamos kreivės), $g \times s$; D – kohezija (neigiamos kreivės maksimumas), g.

EK mėginio tepumo testo grafinė išraiška



E – kietumas (teigiamos kreivės maksimumas), g; F – šlyties darbas (plotas virš neigiamos kreivės), $g \times s$.

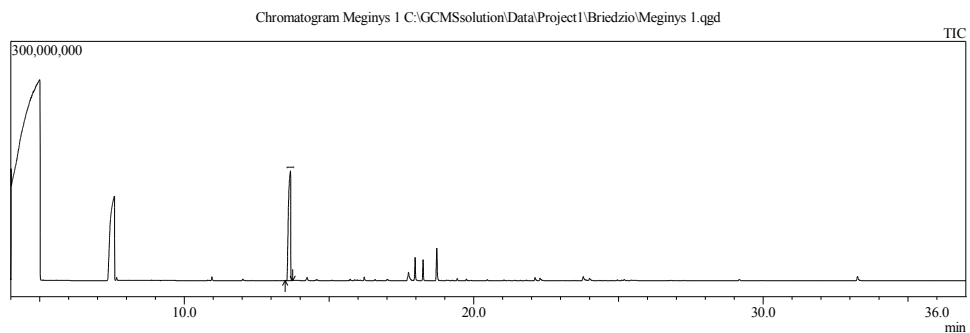
Pieno rūgštis chromatogramų sulyginimas su kontrole

Mėginys – PR-2; standartas – pieno r. standartinis tirpalas; kontrolė – mėginys be tiriamosios medžiagos (pieno r.).

Pieno rūgštis iš EK PR-2 skvarbos tyrimo chromatograma (1 mėginys)

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 2023.10.25 17:55:16
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : Mėginys 1
 Sample ID :
 Tray : 2
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 34
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 1.qgd
 Org Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 1.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Org Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\20230413.qgt
 Modified by : Admin
 Modified : 2023.10.26 11:15:45

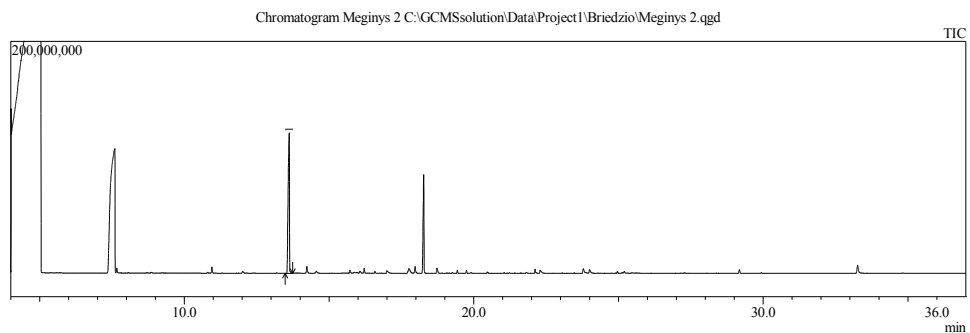


Peak Report TIC					
Peak#	R.Time	Area	Area%	Mark	Name
1	13.668	735763938	100.00	MI	Lactic acid, 2TBDMS derivative
		735763938	100.00		

Pieno rūgštis iš EK PR-2 skvarbos tyrimo chromatograma (2 mėginys)

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 2023.10.25 18:45:17
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : Mėginys 2
 Sample ID :
 Tray : 2
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 35
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 2.qgd
 Org Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 2.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Org Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\20230413.qgt
 Modified by : Admin
 Modified : 2023.10.26 11:16:57

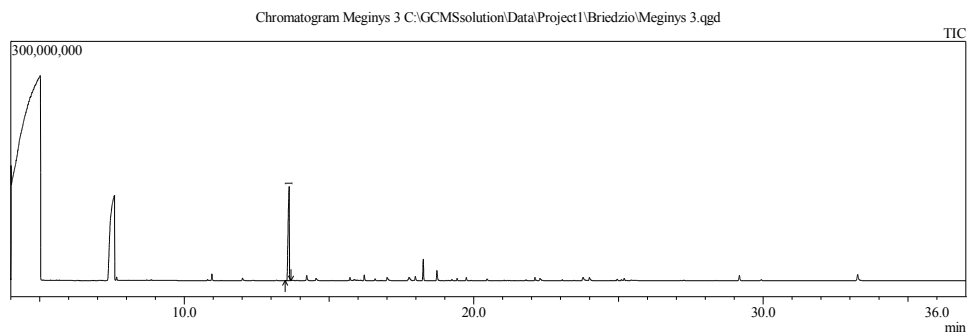


Peak Report TIC					
Peak#	R.Time	Area	Area%	Mark	Name
1	13.625	388645258	100.00	MI	Lactic acid, 2TBDMS derivative
		388645258	100.00		

Pieno rūgštis iš EK PR-2 skvarbos tyrimo chromatograma (3 mėginys)

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 2023.10.25 19:35:22
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : Mėginys 3
 Sample ID :
 Tray : 2
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 36
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 3.qgd
 Org Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 3.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Org Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\20230413.qgt
 Modified by : Admin
 Modified : 2023.10.26 11:17:36

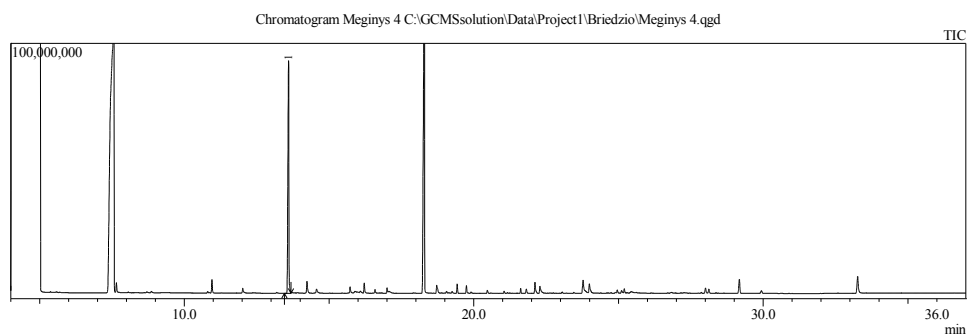


Peak Report TIC					
Peak#	R.Time	Area	Area%	Mark	Name
1	13.622	356112081	100.00	MI	Lactic acid, 2TBDMS derivative
		356112081	100.00		

Pieno rūgštis iš EK PR-2 skvarbos tyrimo chromatograma (4 mėginys)

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 2023.10.25 20:25:26
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : Mėginys 4
 Sample ID :
 Tray : 2
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 37
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 4.qgd
 Org Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 4.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Org Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\20230413.qgt
 Modified by : Admin
 Modified : 2023.10.26 11:18:32

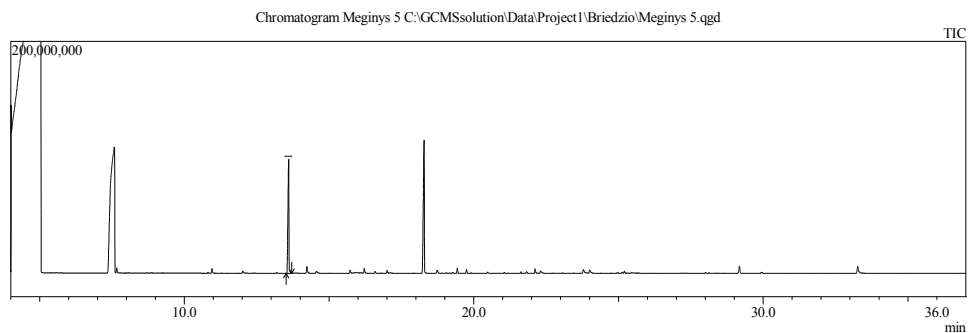


Peak Report TIC					
Peak#	R.Time	Area	Area%	Mark	Name
1	13.603	226484053	100.00	MI	Lactic acid, 2TBDMS derivative
		226484053	100.00		

Pieno rūgštis iš EK PR-2 skvarbos tyrimo chromatograma (5 mėginys)

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 2023.10.25 21:15:29
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : Mėginys 5
 Sample ID :
 Tray : 2
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 38
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 5.qgd
 Org Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 5.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Org Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\20230413.qgt
 Modified by : Admin
 Modified : 2023.10.26 11:19:17

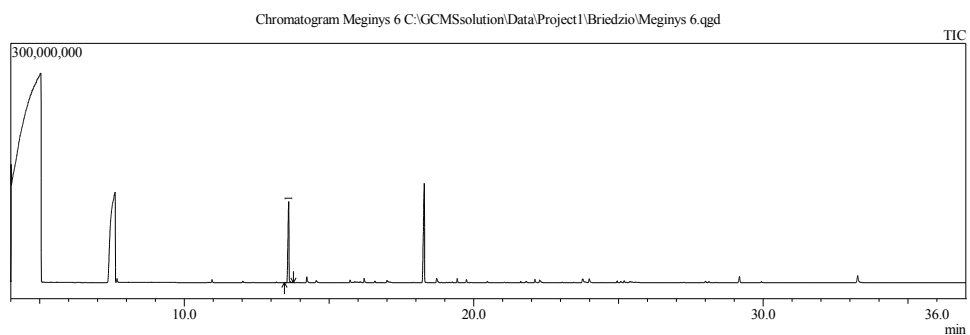


Peak Report TIC					
Peak#	R.Time	Area	Area%	Mark	Name
1	13.606	238874640	100.00	MI	Lactic acid, 2TBDMS derivative
		238874640	100.00		

Pieno rūgštis iš EK PR-2 skvarbos tyrimo chromatograma (6 mėginys)

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 2023.10.25 22:05:34
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : Mėginys 6
 Sample ID :
 Tray : 2
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 39
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 6.qgd
 Org Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 6.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Org Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\20230413.qgt
 Modified by : Admin
 Modified : 2023.10.26 11:19:58

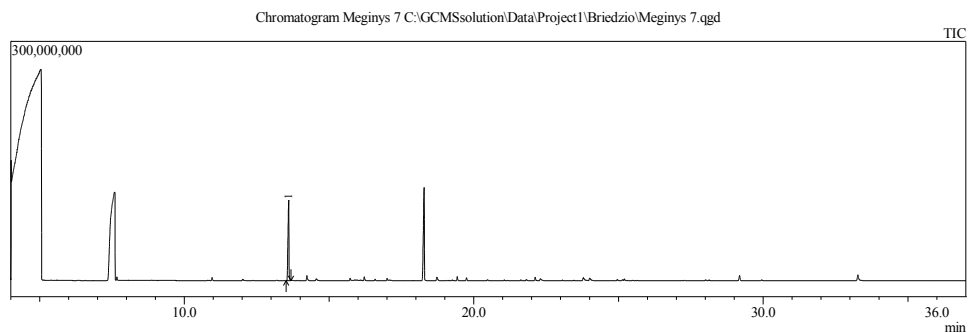


Peak Report TIC					
Peak#	R.Time	Area	Area%	Mark	Name
1	13.608	258085288	100.00	MI	Lactic acid, 2TBDMS derivative
		258085288	100.00		

Pieno rūgštis iš EK PR-2 skvarbos tyrimo chromatograma (7 mėginys)

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 2023.10.25 22:55:38
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : Mėginys 7
 Sample ID :
 Tray : 2
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 40
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 7.qgd
 Org Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Briedzio\Mėginys 7.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Org Method File : C:\GCMSsolution\Data\Gintaras\Metodai\Amino r split10.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\20230413.qgt
 Modified by : Admin
 Modified : 2023.10.26 11:21:52



Peak Report TIC					
Peak#	R.Time	Area	Area%	Mark	Name
1	13.607	239951053	100.00	MI	Lactic acid, 2TBDMS derivative
		239951053	100.00		

CURRICULUM VITAE

Surname, Name: Modestas Kybartas
Address: Institute of Microbiology and Virology, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania
Telephone: +370 612 51240; +370 671 18535
E-mail: modestas.kybartas@lsmu.lt, kmodestas@yahoo.com

Education

2015–2024 PhD studies in Veterinary, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania
2001–2007 Master degree in Veterinary Medicine at the Veterinary Academy, Kaunas, Lithuania

Work experience

11/2013–until now UAB Ruvera, Šiauliai
Qualified person (QP), production of non-sterile veterinary drugs:

- Batch release
- Qualification of production equipment
- Choosing of technological equipment
- Suggestion technological solution
- Key person in the team implementing GMP

12/2020–until now UAB Ruvera, Šiauliai
Head of Quality Control, production of veterinary cosmetics, biocides, human cosmetic, medical devices

- Production process control
- Control of starting materials, packaging materials, intermediate, bulk and finished products
- Development of specifications, procedures, test methods and quality programs
- Development and Control of Quality systems

- UAB Ruvera, Šiauliai
Head of Quality Control, production of veterinary cosmetics, biocides, human cosmetic, medical devices
- Production process control
 - Control of starting materials, packaging materials, intermediate, bulk and finished products
 - Development of specifications, procedures, test methods and quality programs
 - Development and Control of Quality systems
- 06/2019–12/2020 UAB Ruvera, Šiauliai
Innovation specialist
- Achieving the development goals
 - Assessment and search for new market opportunities
 - Cooperation with scientific institutions
 - Analysis and improvement of existing products
- 08/2007–10/2013 UAB Ruvera, Šiauliai
Head of production, production of non-sterile veterinary drugs, veterinary cosmetics, biocides, human cosmetic, medical devices
- Choosing of technological equipment
 - Suggestion technological solution
 - Process optimization
- 04/2007–07/2007 UAB Ruvera, Šiauliai
Assistant Head of production
- Assistance to Head of production
- 05/2006–04/2007 UAB Senukų prekybos centras, Kaunas
- Junior storekeeper

Certificates

- License for Veterinary Pharmacy Qualified person (No. VFKA-3)
- License for Veterinary Pharmacy (No. FVF-177) till 2023-02-01
- License for Veterinary Practice (No. VP-500)
- Industrial Drug Technology (Certificate No 128), issued of Kaunas University of Medicine
- Two days training course ECA – Microbiology for Non-Microbiologists (Berlin)

- Two days training course “The Changing Role of the QP in the EU and the Supporting Pharmaceutical Quality Management Systems (PQMS)”
- Two days training course “Commissioning & Qualification”
- Two days training course “Risk analysis”
- Vet congress Lithuania 2016 (poultry disease, cattle disease)
- External training in microbiological resistance topics
- External training on treatment and prevention of animal diseases
- External training in animal nutrition, health and product quality topics
- External training in dairy cows farming, calves growing topics
- External training in pest control topics

PADĖKA

Dėkoju savo darbo vadovui dr. Raimundui Mockeliūnui už kantrų vadovavimą, motyvaciją, pamokymus, pastabas ir visapusišką pagalbą atliekant tyrimus, rengiantis konferencijoms, rašant straipsnius ir disertaciją.

Už vertingas pastabas, patarimus ir taiklias įžvalgas rengiant disertacinį darbą dėkoju prof. dr. Modestui Ružauskui.

Dėkoju visiems LSMU Mikrobiologijos ir virusologijos instituto darbuotojams už pagalbą atliekant laboratorinius tyrimus bei rengiant publikacijas.

Dėkoju savo šeimai: Kristijonui, Justinui, Ernestai ir visiems artimiesiems, kurie visada buvo kartu ir palaikė doktorantūros studijų metu.