



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК: 619:612.12:618.19-002.1:636.2

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.3.13

ИНТЕРЛЕЙКИН-6 КАК БИОМАРКЕР КЛИНИЧЕСКИХ И СУБКЛИНИЧЕСКИХ СТРЕПТОКОККОВЫХ МАСТИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Макавчик С.А.* – д-р ветеринар. наук., доц. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии (ORCID 0000-0001-5435-8321); **Авдеенко В.С.** – д-р ветеринар. наук, проф. кафедры генетических и репродуктивных биотехнологий (ORCID 0000-0001-6154-275X); **Павлова В.С.** – студ. факультета ветеринарной медицины.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

*groza81@mail.ru

Ключевые слова: маститы, коровы, *Streptococcus spp.*, иммунный ответ, интерлейкин-6.

Key words: mastitis, cows, *Streptococcus spp.*, immune response, interleukin-6.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда 23-26-00284, <https://rscf.ru/project/23-26-00284/>.

Поступила: 19.07.2024

Принята к публикации: 20.09.2024

Опубликована онлайн: 01.10.2024



РЕФЕРАТ

Интерлейкин-6 является одним из наиболее важных противовоспалительных цитокинов, который активирует врожденные и приобретенные механизмы иммунного ответа животных. Целью исследования была оценка интерлейкина-6 как биомаркера клинических и субклинических маститов дойных коров. Для лабораторных исследований были отобраны образцы молока и крови от коров голштино-фризской породы, больных маститом ($n=20$) и здоровых ($n=10$) в Новгородской области. В исследование для изучения уровня интерлейкина-6 (ИЛ-6) были включены животные с инфекционными маститами коров, которые вызваны *Streptococcus spp.* Уровни ИЛ-6 в молоке от коров как с клиническим маститом, так и с субклиническим маститом по сравнению с контрольной группой по максимальным значениям соответствовали: $1069,47 \pm 0,33$ пг/мл против $4004,96 \pm 0,25$ пг/мл в группе с клиническим маститом (КМ), $p < 0,05$; и против $1903,22$ пг/мл в группе с субклиническим маститом (СКМ), $p < 0,05$. Уровни ИЛ-6 в молоке здоровых коров составили $1066,99 \pm 0,33$ пг/мл и были значительно ниже в 1,7-3,7 раза, чем в молоке всех коров с инфекционным маститом, вызванным *Streptococcus spp.* Выявлена разница в уровнях ИЛ-6 в сыворотке крови между ре-

зультатами, полученными в группе животных с клиническим и субклиническим маститом ($1069,47 \pm 0,13$ пг/мл против $700,99 \pm 0,22$ пг/мл). Концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови здоровых коров находилась в пределах $633,49 \pm 0,53$ пг/мл и отличалась от уровня ИЛ-6 в сыворотке крови всех групп коров с инфекционным маститом в клинической или субклинической форме ($700,99 \pm 0,52$ пг/мл и $1069,47 \pm 0,33$ пг/мл соответственно). Наши результаты свидетельствуют о том, что у коров с инфекционным маститом, вызванным *Streptococcus spp.*, развивается местная иммунная реакция в вымени в ответ на патоген. Таким образом, мониторинг уровня интерлейкина-6 в молоке может позволить раннее выявление мастита, что особенно важно в случаях субклинического воспаления молочной железы.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Инфекционный мастит – это воспалительная реакция тканей вымени в молочной железе, вызванная микробной инфекцией. Он считается наиболее распространенным заболеванием среди поголовья дойных коров [1, 6, 7].

К этиологическим агентам относятся различные грамположительные и грамотрицательные бактерии и грибы. Данные литературы указывают на то, что среди возбудителей мастита в настоящее время преобладают виды *Streptococcus spp.*, что также было подтверждено в нашем исследовании [2, 3, 4, 5, 8].

Streptococcus spp. может вызывать как субклиническую форму мастита, так и ту, которая протекает с ярко выраженными клиническими признаками. Субклиническая форма мастита очень опасна, поскольку трудно выявляется, длительно сохраняется и влияет на качество и продуктивность молока. В большинстве случаев инфицирование вымени *Streptococcus spp.* вызывает необратимые изменения, что приводит к атрофии секреторной ткани и потери способности вырабатывать молоко [10, 11].

Инфекционные процессы в молочной железе вызывают иммунные реакции, приводящие к аномальной секреции цитокинов и нарушению репродуктивной системы, и у коров снижается уровень стельности и повышается риск абортов [11].

Реакция организма на инфекцию – это воспалительная реакция и быстрая выработка белков острой фазы (сывороточный амилоид А, компоненты комплемента и др.). Исследования авторов показали зна-

чительное увеличение концентрации амилоида А в молоке коров, страдающих стрептококковым маститом [9].

Основным индуктором выработки печенью белков острой фазы во время инфекции является интерлейкин-6. Патогенные микроорганизмы, проникающие в вымя, стимулируют выделение различной концентрации этого цитокина различными клетками, включая лимфоциты, моноциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки и фибробласты. ИЛ-6 был признан ранним, но неспецифическим показателем мастита. ИЛ-6 как провоспалительный цитокин, который активирует врожденные и приобретенные механизмы иммунного ответа. Причиной использования в качестве биомаркера Интерлейкина-6 является его центральная роль в активации и поддержании воспалительной реакции, что позволяет выявить субклиническую форму инфекционного мастита и уровень воспаления [8, 9, 10, 11].

Таким образом, изучение корреляции и роли концентрации медиаторов воспаления, в том числе интерлейкина-6 важны при дифференциальной диагностике ряда воспалительных болезней животных, в том числе и при стрептококковом мастите крупного рогатого скота.

Целью исследования была оценка интерлейкина-6 как биомаркера клинических и субклинических маститов дойных коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Материал для лабораторных исследований (образцы молока и крови) был отобран у коров голштино-фризской породы

в Новгородской области.

Образцы крови отобраны из хвостовых вен от каждой коровы в вакуумные пробирки RusTech с активатором свертывания крови. Для получения сыворотки образцы крови центрифугировали при 1000 ×g в течение 20 мин. Затем прозрачную сыворотку разливали в пробирки типа "Эппендорф" и хранили при температуре 70°C до использования в анализах.

Образцы секрета вымени были взяты от коров, пораженных клиническим и субклиническим маститом, сразу после начала воспаления. Перед отбором образцов не проводилось никакой обработки.

Один образец свежего молока от каждой исследуемой коровы был использован для определения количества соматических клеток (КСК), которое определяли набором Экспресс-тест на мастит производства ООО «Нерохим», Россия.

Молоко из третьей пробирки было использовано для бактериологического исследования. Провели посев в объеме 0,01 мл из исследуемых образцов молока на агаровые среды ГРМ-агар (Оболensk, Россия), в которые добавляли 5% бараньей крови.

После инкубации в течение 16-18 часов при температуре 37°C в аэробных условиях оценивали морфологию колоний, проводили тест на наличие каталазы и готовили микроскопические препараты, окрашенные по Граму.

Идентификация видов стрептококков проводилась с использованием с помощью тест-системы STREPTtest24 (Чешская Республика).

Дифференцирующие дополнительные тесты проведены на каталазную активность, скрытую гемолитическую активность, отсутствие роста на энтерококкагаре (Оболensk, Россия). Второй образец молока центрифугировали при 1000 × g в течение 20 мин, затем переносили в пробирки Эппендорфа и замораживали при температуре -70°C до определения уровня цитокинов в образцах при помощи иммуноферментного анализа с применением набора (Cloud-Clone Corp, Китай) соглас-

но инструкции производителя. Учет проводили на приборе (Multiscan FC, Thermo Scietipic, США) при длине волны 450 нм. В работе использована программа CurveExpert Basic.

Полученные цифровые данные обработаны методом вариационной статистики с определением достоверности по Стьюденту.

Использована общепринятая характеристика вариационного ряда, где его средняя арифметическая величина M , равная сумме произведений вариант (y) на частоты (p), деленная на сумму частот (N).

Цифровые данные обрабатывали посредством программы STATISTICA (StatSoft Inc., США, версия 7.0), адаптированной к ПК Microsoft Excel 2000 SPSS 10.0.5 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Исследование было проведено на 30 образцах молока и 30 образцах сыворотки от коров, включающие образцы молока ($n=10$) и сыворотки ($n=10$) от животных с клиническим маститом, а также с субклиническим маститом исследуемое молоко ($n=10$) и сыворотка ($n=10$), вызванным *Streptococcus spp.*, и по 10 проб молока и сыворотки от здоровых коров.

У коров наблюдалось субклиническое воспаление без признаков заболевания, а также были обнаружены отклонения в молоке, такие как сгустки и хлопья в качестве клинических признаков мастита, а также припухлость, покраснение или болезненность молочной железы в качестве видимых признаков. В группу заболевших вошли коровы со 2-ой по 5-ую лактации. Диапазон содержания концентрации соматических клеток в молоке этих коров с инфекционным маститом составлял от 100 000 до 500 000 клеток/мл.

В дальнейшее исследование для изучения уровня цитокинов, таких как интерлейкина-6 (ИЛ-6) были включены животные с инфекционными маститами коров, которые вызваны *Streptococcus spp.* Видовой спектр, выделенных стрептококков, представлен: *Streptococcus dysgalactiae* (4 изолята), *Streptococcus uberis* (4 изолята),

Streptococcus agalactiae (2 изолята), а также *Streptococcus spp.* (10 изолятов).

Также были взяты образцы молока и крови у 10 здоровых коров без признаков заболевания. Эта контрольная группа состояла исключительно из коров в период первой лактации, которые производили молоко с КСК менее 100 000 клеток/мл.

Результаты исследования уровня ИЛ-6 в биоматериале с применением иммуноферментного анализа представлены в табл. 1.

Уровни ИЛ-6 в молоке здоровых коров составили $1066,99 \pm 0,33$ пг/мл и были значительно ниже в 1,7-3,7 раза, чем в молоке всех коров, страдающих маститом, вызванным *Streptococcus spp.*

Следует отметить, что достоверная разница в уровне концентрации ИЛ-6 в молоке по сравнению с контрольной группой была зафиксирована как у коров с клиническим маститом, так и с субклиническим маститом по максимальным значениям установлена: $1069,47 \pm 0,33$ пг/мл против $4004,96 \pm 0,25$ пг/мл в группе с КМ, $p < 0,05$; и против $1903,22 \pm 0,13$ пг/мл в группе с СКМ, $p < 0,05$.

Анализируя результаты табл.1, также выявлена разница в уровнях ИЛ-6 в сыворотке крови между результатами, полученными в группе животных с КМ и СКМ ($1069,47 \pm 0,13$ пг/мл против $700,99 \pm 0,22$ пг/мл).

Концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови здоровых коров находилась в пределах $633,49 \pm 0,53$ пг/мл и отличалась от уровня ИЛ-6 в сыворотке крови всех групп коров

при стрептококковом мастите в клинической или субклинической форме ($700,99 \pm 0,52$ пг/мл и $1069,47 \pm 0,33$ пг/мл соответственно).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что содержание ИЛ-6 в молоке коров с клиническим маститом, было значительно выше в 4 раза, чем в сыворотке крови клинически маститных коров.

Настоящее исследование показало значительно более высокие концентрации ИЛ-6 в молоке (в 4 раз) по сравнению с молоком здоровых коров. Наши данные согласуются с результатами исследования, проведенного Bochniarz и соавторами (2024), которое показало уровни ИЛ-6 в молоке от здоровых коров варьировали от 6,09 до 80,24 пг/мл (медиана 26,6 пг/мл) и были значительно ниже, чем в молоке от коров как с клиническим, так и с субклиническим маститом.

Настоящее исследование показывает, что у коров с маститом, вызванным *Streptococcus spp.*, развивается местный иммунный ответ в молочной железе в ответ на патоген. Мониторинг уровня ИЛ-6 в молоке может позволить на ранней стадии выявить инфекционный мастит, что особенно важно в случаях субклинического воспаления.

Благодаря своим многочисленным важным функциям во время воспаления, таким как защита организма посредством иммунного ответа и регуляции воспаления, ИЛ-6 является одним из наиболее важных провоспалительных цитокинов [11, 12].

Таблица 1 – Концентрация интерлейкина - 6 (ИЛ-6) в молоке и сыворотке здоровых коров и коров с клиническим и субклиническим маститом, вызванных *Streptococcus spp.*

Наименование биологического материала	Наименование группы животных		
	Группа клинически здоровых коров (n = 10), контрольная группа; среднее значение для группы	Группа коров с субклиническим маститом (СКМ) (n=10), среднее значение для группы	Группа коров с клиническим маститом (КМ) (n=10), среднее значение для группы
Секрет вымени	$1069,47 \pm 0,33$ пг/мл	$1903,22 \pm 0,13$ пг/мл	$4004,96 \pm 0,25$ пг /мл
Сыворотка крови	$633,49 \pm 0,53$ пг/мл	$700,99 \pm 0,52$ пг / мл	$1069,47 \pm 0,33$ пг/мл

Примечание: $P < 0,05$ – степень достоверности

Исследования показали, что уровень ИЛ-6 зависит от ряда факторов, включая форму течения мастита, фазу инфекции и тип микроорганизмов, вызывающих мастит.

Настоящее исследование показывает, что определение уровня ИЛ-6 может быть использовано в ветеринарных лабораториях для диагностики субклинических маститов.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Мы отметили повышенную концентрацию провоспалительных цитокинов ИЛ-6, которая содержится в молоке, в сыворотке крови, как у коров с клиническим, так и субклиническим маститом. Лабораторный контроль этого цитокина в молоке позволил обнаружить субклинический мастит, таким образом, применить меры и ограничить распространение микроорганизмов среди животных, и выделение их в окружающую среду.

Таким образом, следует подчеркнуть, что последствия инфекции зависят от реакции организма на ранних стадиях заболевания, включая активность высвобождаемых цитокинов. Роль цитокинов заключается в индуцировании или ингибировании многочисленных процессов. Мастит, независимо от того, протекает ли он естественным путем или вызван экспериментально, вызывает увеличение количества соматических клеток и уровня цитокинов, вырабатываемых в молоке, которые отличаются от вида возбудителя.

Изучение уровня цитокинового профиля позволяет получить информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток, тяжести воспалительного процесса и его переходе на системный уровень при инфекционном мастите, который может быть вызван разными возбудителями, но в данном исследовании установлен уровень цитокина при стрептококковом мастите.

INTERLEUKIN-6 AS A BIOMARKER OF CLINICAL AND SUBCLINICAL STREPTOCOCCAL MASTITIS IN CATTLE

Makavchik S.A. * – D.V.N., Associate

Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology (ORCID 0000-0001-5435-8321); **Avdeenko V.S.** – D.V.N., Professor of the Department of Genetic and Reproductive Biotechnologies (ORCID 0000-0001-6154-275X); **Pavlova V.S.** – student of the veterinary faculty
St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

*groza81@mail.ru

Financing: The study was supported by the Russian Science Foundation grant 23-26-00284, <https://rscf.ru/project/23-26-00284/>.

ABSTRACT

Interleukin-6 is one of the most important pro-inflammatory cytokines, activating the innate and acquired mechanisms of the immune response of animals. The aim of the study was to evaluate interleukin-6 as a biomarker of clinical and subclinical mastitis in dairy cows. For laboratory studies, milk and blood samples were collected from Holstein-Friesian cows with mastitis (n=20) and healthy ones (n=10) in the Novgorod region. The study to study the level of interleukin-6 (IL-6) included animals with infectious cow mastitis caused by *Streptococcus* spp. The levels of IL-6 in milk from cows with both clinical mastitis and subclinical mastitis compared with the control group at maximum values corresponded to: 1069.47±0.33 pg/ml versus 4004.96±0.25 pg/ml in group with clinical mastitis (CM), $p < 0.05$; and against 1903.22 pg/ml in the group with subclinical mastitis (SCM), $p < 0.05$. The levels of IL-6 in the milk of healthy cows were 1066.99±0.33 pg/ml and were significantly lower by 1.7-3.7 times than in the milk of all cows suffering from mastitis caused by *Streptococcus* spp. A difference was detected in the levels of IL-6 in the blood serum between the results obtained in the group of animals with CM and SCM (1069.47±0.13 pg/ml versus 700.99±0.22 pg/ml). The concentration of IL-6 in the blood serum of healthy cows was in the range of 633.49±0.53 pg/ml and differed from the level of IL-6 in the blood serum of all groups

of cows suffering from clinical or subclinical mastitis (700.99 ± 0.52 pg/ml and 1069.47 ± 0.33 pg/ml, respectively). Our results suggest that cows suffering from mastitis caused by *Streptococcus* spp. develop a local immune response in the udder in response to the pathogen. Thus, monitoring the level of interleukin-6 in milk may allow early detection of mastitis, which is especially important in cases of subclinical inflammation of the mammary gland.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Антонецкий И.В., Плешакова В.И., Локтева А.С., Лещева Н.А. Видовой состав и антибиотикорезистентность бактериальных изолятов, выделенных от животных Омской области. Вестник КрасГАУ. 2023; 6 (195):97-103.
2. Герунов Т.В., Герунова Л.К., Плешакова В.И., Конев А.В. Оппортунистические инфекции у животных: причины распространения и меры профилактики. Вестник КрасГАУ. 2022; 10 (187): 152-160.
3. Киреева Л.С., Макавчик С.А. Идентификация и изучение антибиотикорезистентности бактерий, выделенных из маститного молока. Бактериология. 2018; 3 (1): 67-70.
4. Макавчик С.А., Сухинин А.А., Кротова А.Л., Селиванова Л.В., Приходько Е.И. Этиологическая структура возбудителей мастита коров и их характеристика чувствительности к антибактериальным препаратам в Северо-Западном регионе. Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2020; № 1, С. 66-71.
5. Смирнова Л.И., Приходько Е.И., Макавчик С.А. Атипичные свойства *Streptococcus dysgalactiae* -возбудителей мастита коров. Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2020; № 4: 56-59.
6. Smirnova L.I., Makavchik S.A., Sukhinin A.A., Prikhodko E.I., Zbrovskaya A.V. Bacteriological monitoring of the pathogens of mastitis in dairy complex of the north-west region of the Russian Federation. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2019; T.10. №

1:2013 -2020.

7. Bochniarz M, Ziomek M, Szczubiał M, Dąbrowski R, Wochnik M, Kurek Ł, Kosior-Korzecka U, Nowakiewicz A. Interleukin-6 as a Milk Marker of Clinical and Subclinical Intramammary Infections (IMI) in Cows Caused by *Streptococcus* spp. *Animals* (Basel). 2024; № 4; 14(7):1100. doi: 10.3390/ani14071100.
8. Bochniarz M., Szczubiał M., Brodzki P., Krakowski L., Dąbrowski R. Serum amyloid A as an marker of cow's mastitis caused by *Streptococcus* sp. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 72:101498. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101498.
9. Burakova I., Gryaznova M., Smirnova Yu., Morozova P., Mikhalev V., Zimnikov V., Latsigina I., Shabunin S., Mikhailov E., Syromyatnikov M. Association of milk microbiome with bovine mastitis before and after antibiotic therapy/ *Veterinary World*. 2023: 2389-2402.
10. Vitenberga-Verza Z., Pilmane M., Šerstņova K., Melderis I., Gontar Ł., Kochański M., Drutowska A., Maróti G., Prieto-Simón B. Identification of Inflammatory and Regulatory Cytokines IL-1 α -, IL-4-, IL-6-, IL-12-, IL-13-, IL-17A-, TNF- α -, and IFN- γ -Producing Cells in the Milk of Dairy Cows with Subclinical and Clinical Mastitis. *Pathogens*. 2022; 11:372. doi: 10.3390/pathogens11030372.
11. Wang N, Zhou C, Basang W, Zhu Y, Wang X, Li C, Chen L, Zhou X. Mechanisms by which mastitis affects reproduction in dairy cow: A review. *Reprod Domest Anim.* – 2021.- №56(9) –P.1165-1175. doi: 10.1111/rda.13953.

REFERENCES

1. Antonevsky I.V., Pleshakova V.I., Lokteva A.S., Lescheva N.A. Species composition and antibiotic resistance of bacterial isolates isolated from animals in the Omsk region. *Bulletin of KrasGAU.* 2023; 6 (195):97-103.
2. Gerunov T.V., Gerunova L.K., Pleshakova V.I., Konev A.V. Opportunistic infections in animals: causes of spread and preventive measures. *Bulletin of KrasGAU.* 2022; 10 (187): 152-160.

3. Kireeva L.S., Makavchik S.A. Identification and study of antibiotic resistance of bacteria isolated from mastitis milk. *Bacteriology*. 2018; 3(1): 67-70.
4. Makavchik S.A., Sukhinin A.A., Krotova A.L., Selivanova L.V., Prihodko E.I. Etiological structure of causative agents of cow mastitis and their characteristics of sensitivity to antibacterial drugs in the North-West region. Questions legal regulation in veterinary medicine. 2020; No. 1, pp. 66-71.
5. Smirnova L.I., Prihodko E.I., Makavchik S.A. Atypical properties of *Streptococcus dysgalactiae*, the causative agent of cow mastitis. Issues of legal regulation in veterinary medicine. 2020; No. 4: 56-59.
6. Smirnova L.I., Makavchik S.A., Sukhinin A.A., Prihodko E.I., Zabrovskaya A.V. Bacteriological monitoring of the pathogens of mastitis in dairy complex of the north-west region of the Russian Federation. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2019; T.10.No. 1:2013 -2020.
7. Bochniarz M, Ziomek M, Szczubiał M, Dąbrowski R, Wochnik M, Kurek Ł, Kosior-Korzecka U, Nowakiewicz A. Interleukin-6 as a Milk Marker of Clinical and Subclinical Intramammary Infections (IMI) in Cows Caused by *Streptococcus* spp. *Animals (Basel)*. 2024; № 4;14(7):1100. doi: 10.3390/ani14071100.
8. Bochniarz M., Szczubiał M., Brodzki P., Krakowski L., Dąbrowski R. Serum amyloid A as an marker of cow's mastitis caused by *Streptococcus* sp. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2020;72:101498. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101498.
9. Burakova I., Gryaznova M., Smirnova Yu., Morozova P., Mikhalev V., Zimnikov V., Latsigina I., Shabunin S., Mikhailov E., Syromyatnikov M. Association of milk microbiome with bovine mastitis before and after antibiotic therapy/ *Veterinary World*. 2023: 2389-2402.
10. Vitenberga-Verza Z., Pilmane M., Šerstņova K., Melderis I., Gontar Ł., Kochański M., Drutowska A., Maróti G., Prieto-Simón B. Identification of Inflammatory and Regulatory Cytokines IL-1 α -, IL-4-, IL-6-, IL-12-, IL-13-, IL-17A-, TNF- α -, and IFN- γ -Producing Cells in the Milk of Dairy Cows with Subclinical and Clinical Mastitis. *Pathogens*. 2022;11:372. doi: 10.3390/pathogens11030372.
11. Wang N, Zhou C, Basang W, Zhu Y, Wang X, Li C, Chen L, Zhou X. Mechanisms by which mastitis affects reproduction in dairy cow: A review. *Reprod Domest Anim.* – 2021.- №56(9) –P.1165-1175. doi: 10.1111/rda.13953.