

Capítulo 8

Infección y respuesta de la glándula mamaria bovina

G. Torres^{1,2} Bacteriólogo, MSc, Dr.Sci.

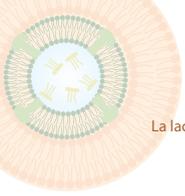
1. Vía y mecanismos de ingreso de los patógenos mamarios

Las bacterias pueden llegar a la piel del pezón de la glándula mamaria a través de las manos del ordeñador, pezoneras, leche o cualquier elemento contaminado con el que tenga contacto. Para ingresar al pezón, la bacteria primero debe sobrepasar las barreras naturales generadas por el esfínter y el tapón de queratina, empleando sus propios mecanis-

1. Grupo de Investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia.

2. Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES.





mos de adhesión y multiplicación que le permiten avanzar por el canal. También puede ingresar ayudada por elementos físicos que la arrastran hacia el interior como las cánulas de aplicación de antibióticos y las diferencias de presión ocasionadas por las fluctuaciones de vacío durante el ordeño mecánico. Una vez la bacteria alcanza el interior del pezón, debe superar la acción expulsiva del ordeño frecuente, por lo que en este punto la capacidad de adherencia al tejido influirá sobre la permanencia dentro del cuarto infectado, evento decisivo en la fase temprana de la patogénesis (Philpot & Nickerson, 2000).

Se ha descrito que las bacterias Gram positivas se adhieren mejor al tejido que las bacterias Gram negativas. *S. aureus* es una de los que mejor se adhiere al tejido interno de la glándula (Philpot & Nickerson, 2000; Foster et al., 2014). Esta capacidad de adherencia se le atribuye a una familia de proteínas conocidas como componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMM), las cuales hacen parte del grupo de proteínas de anclaje a la pared celular (CWA). En *S. aureus* se han identificado alrededor de 28 diferentes CWA y su expresión puede variar entre cepas (genotipo), por condiciones ambientales o necesidades bacterianas.

Las MSCRAMM son proteínas de superficie que median el ataque a componentes extracelulares, tales como fibrinógeno, fibronectina y colágeno; incluso, algunas presentan funciones adicionales a la adhesión (Foster et al., 2014). Las proteínas MSCRAMM más estudiadas en *S. aureus* son las de unión a Fibronectina A y B (FnBPA and FnBPB), porque además de mediar la unión a fibronectina, también están involucradas en los procesos de invasión celular, uno de los factores de virulencia más importantes de esta bacteria (Brouillette et al., 2003; Budd, Mitchell & Keane, 2016).



La fibronectina es una glicoproteína presente en la matriz extracelular y está compuesta por tres módulos estructurales (tipo 1, tipo 2 y tipo 3). Las FnBP de *S. aureus* presentan alta afinidad por el módulo tipo 1, mientras que, el módulo tipo 3 es reconocido por la integrina $\alpha 5\beta 1$, un receptor expresado en la superficie de las CEM (Schwarz-Linek et al., 2003; Foster et al., 2014); en este caso la fibronectina actúa como un puente entre la bacteria y la célula (Fowler et al., 2000) (Figura 1A). Un estudio reciente demostró que la expresión de las FnBP es cepa dependiente y su ausencia en la cepa evaluada redujo la adhesión a las CEM hasta en un 40% y la invasión en un 95%, comparado con la cepa control (Budd et al., 2016).

2. Reconocimiento inicial de la bacteria

El contacto de la bacteria con las células epiteliales del tejido y con las células somáticas (CS) durante su ingreso desencadena la respuesta inicial contra el patógeno. La importancia de las CEM radica en que son inmunocompetentes y son las células con las que inicialmente entra en contacto la bacteria cuando ingresa. Al ser inmunocompetentes, tienen la capacidad de producir mediadores inflamatorios y quimioquinas que desencadenan la activación y migración de leucocitos, principalmente de neutrófilos, CS predominantes durante la fase aguda de la respuesta (Yang et al., 2008; Günther et al., 2009; Bougarn et al., 2010; Günther et al., 2011).

Las CEM, como las CS, pueden reconocer a los microorganismos mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) ubicados en la superficie o a nivel intracelular (Figura 1B y 1C). Estos receptores se unen a los Patrones Moleculares Asociados a los Microorganismos (MAMP), estructuras como los lipopolisacáridos (LPS) en las bacterias



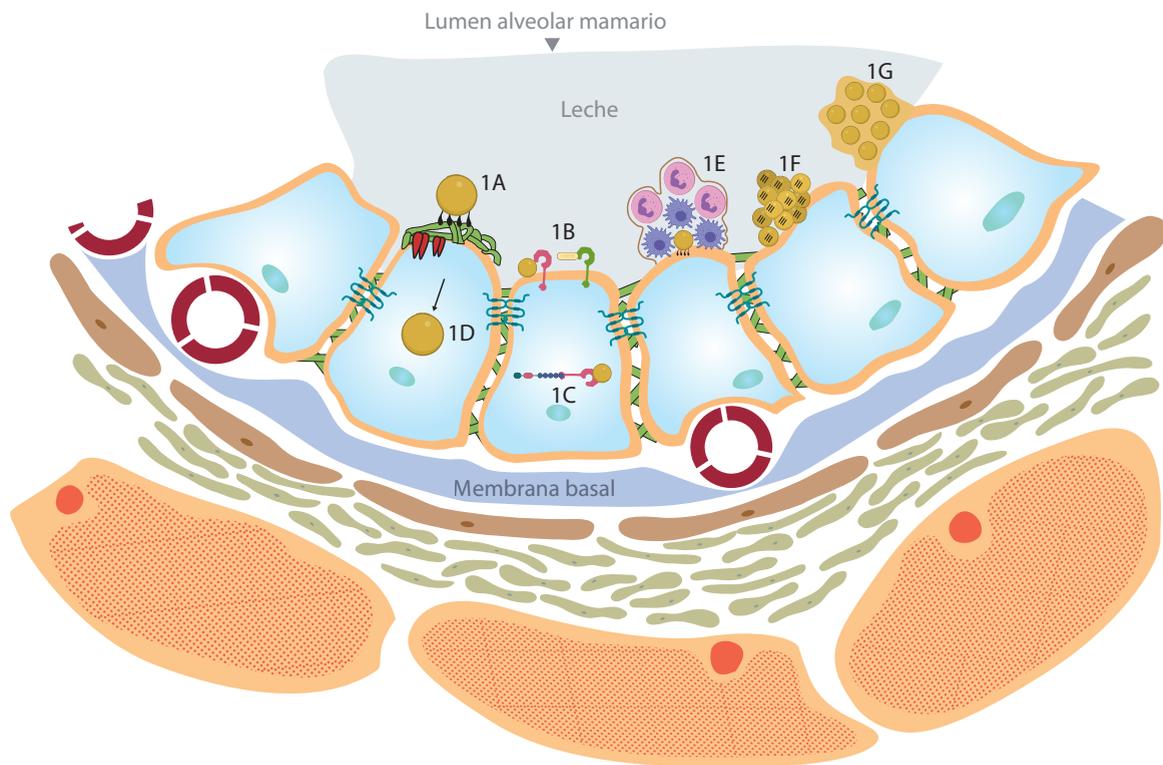


Figura 1. Mecanismos de adhesión, reconocimiento y comportamiento de los patógenos en glándula mamaria. **1A.** Adhesión de *S. aureus* a la fibronectina mediante FnBP y colonización extracelular; **1B** y **1C.** Reconocimiento intra y extracelular de bacterias por medio de TLRs; **1D.** Invasión celular; **1E.** Formación de abscesos; **1F.** Biopelícula independiente de PIA; **1G.** Biopelícula dependiente de PIA.

Fuente: G Torres 2019

Convenciones

	<i>Staphylococcus aureus</i>		CWA		TLR4
	TLR2		$\alpha 5 \beta 1$		Fibronectina
	<i>S. aureus</i> PIA independiente - <i>bap</i> +		NLR		<i>S. aureus</i> PIA dependiente - <i>ica</i> +



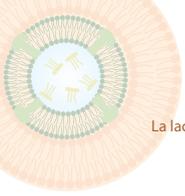
Gram negativas y los ácidos lipoteicoicos (ALT) en las Gram positivas. Los Receptores Tipo Toll (TLR) son una clase de PRRs que reconocen un amplio rango de MAMPs (Bougarn et al., 2010; Abbas et al., 2014). A la fecha se han descrito 13 TLRs en mamíferos; en bovinos solo se reconocen 10 (McGuire et al., 2006; Fu et al., 2013). Generalmente los TLRs son específicos y cada uno tiene la capacidad de unirse a un MAMP. Estudios han demostrado que TLR4 es el receptor responsable del reconocimiento de las bacterias Gram negativas como *E. coli*. En el caso de *S. aureus*, bacteria Gram positiva, el TLR2 es el que se ha asociado a su reconocimiento, debido a que pueden unirse a ALT y al peptidoglicano presentes en la pared bacteriana. El TLR4 no es tan específico, ya que se observó que falló su activación frente a *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis*, bacterias también causantes de mastitis (Farhat et al., 2008; Schukken et al., 2011). El TLR2 también puede reconocer LPS de algunas bacterias Gram negativas (Smith et al., 2003; Park & Lee, 2013).

S. aureus invade eficientemente las células y es reconocido en el citosol por los receptores tipo NOD (NLR), un PRR que interactúa con el peptidoglicano de la pared celular de la bacteria (Abbas et al., 2014; Im et al., 2014; Wang et al., 2015) (Figura 1C).

3. Comportamientos de las bacterias dentro de la glándula mamaria

En el interior de la glándula mamaria las bacterias pueden presentar diferentes comportamientos: permanecer en el ambiente extracelular adheridas a las CEM y secretar las toxinas con las que generan daño al tejido o manipulan el sistema inmune (Figura 1A); invadir las CEM para quedar fuera del alcance de los mecanismos de respuesta inmune o an-





tibióticos (Figura 1D); formar abscesos (quistes), como lo hace *S. aureus* que tiene la capacidad de generar una pseudocápsula a partir de depósitos de fibrina y células inmunes muertas, de manera que evita la entrada de fagocitos y promueve la supervivencia dentro de la lesión (Figura 1E), o generar biopelícula, una conformación bacteriana que le permite evadir la respuesta inmune e incrementar la tolerancia frente a los diferentes agentes antimicrobianos (Figura 1F y 1G). Las biopelículas pueden ser dependientes del polisacárido PIA, sintetizado a partir de la expresión del operón *ica*. Las biopelículas independientes de PIA tienen como base la proteína Bap, la cual es codificada por el gen *bap* (Donlan & Costerton, 2002; Gomes et al., 2016).

Una vez establecida la infección, las bacterias se pueden ubicar a nivel de alvéolos, conductos y cisternas, donde sus productos junto con los de la respuesta inmune pueden afectar la integridad anatómica y funcional de los alvéolos. Esto puede llegar a tal punto que se disminuye la producción de leche por daño en las células secretoras y se altera la barrera hemato-láctea, lo que permite que componentes como cloro, sodio, potasio, hidrógeno, iones hidróxido y sangre se mezclen con la leche (Zhao & Lacasse, 2008; Viguier et al., 2009).

4. Respuesta inmune

La respuesta inmune de la glándula mamaria frente a los microorganismos involucra una serie de acciones coordinadas entre diferentes tipos de células y sus productos. Esta reacción, en algunos casos, finaliza con la eliminación de la infección, pero en otros el patógeno consigue superarla y se genera mastitis persistentes de difícil control. A continuación, se describen los principales mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa con los cuales la glándula mamaria enfrenta a dos de los principales patógenos (Figura 2).



4.1 Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato de la glándula mamaria incluye barreras físicas, tales como el esfínter del pezón y el tapón de queratina; moléculas solubles antimicrobianas como la lactoferrina y defensinas y diferentes tipos de células (CEM, macrófagos, neutrófilos).

4.1.1. Células somáticas

La leche de bovinos sanos presenta normalmente una población residente de células inmunes conocidas como células somáticas (CS). Las células predominantes en este grupo son los macrófagos, pero también contiene neutrófilos, linfocitos y células epiteliales (Tabla 1) (Sordillo, 2005). El recuento normal de CS en un cuarto mamario varía entre 20.000 y 100.000 células/ml (Schukken et al., 2011).

Tabla 1. Porcentaje de cada tipo de célula en leche de bovinos sanos

Macrófagos	Neutrófilos	Linfocitos	CEM	Referencias
35 – 79%	3 – 26%	16 – 28%	2 – 15%	ISO13366-1/IDF148-1 Li et al., 2014
60%	12%	28%	NR	Marino, et al., 2005 Li et al., 2014

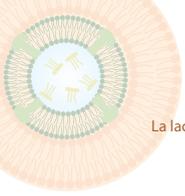
CEM; NR: no reportado

Fuente: elaboración propia

Los macrófagos se consideran la primera línea de defensa celular. Fagocitan y liberan citoquinas y quimioquinas que desencadenan la migración de neutrófilos desde la sangre hasta el sitio de la infección para amplificar la respuesta (Li et al., 2014).

Los neutrófilos, también llamados leucocitos Polimorfonucleares (PMN), son la CS predominantes durante la fase aguda de la respuesta, a tal pun-





to que pueden representar en leche hasta el 92% del Recuento de Células Somáticas (RCS) (Li et al., 2014). Estas células también eliminan a las bacterias invasoras mediante fagocitosis. Diferentes estudios han demostrado la importancia de los neutrófilos en la respuesta frente a las infecciones con *E. coli* (Hill, 1981; Schukken et al., 2011; Herry et al., 2017).

Los linfocitos son un componente de la inmunidad adaptativa y se considera que hacen parte de las CS. Los linfocitos se dividen en dos subpoblaciones: los T (LT), importantes mediadores de la inmunidad celular, y los B, involucrados en la inmunidad humoral (anticuerpos). A su vez, los LT se subdividen en linfocitos CD4+, también conocidos como linfocitos T ayudadores (LTH), y en linfocitos T CD8+, reconocidos por su acción citotóxica (LTC) (Schukken et al., 2011; Abbas et al., 2014). Los LT CD8+ son la población de linfocitos predominante en la glándula mamaria sana (Shafer-Weaver, Pighetti, & Sordillo, 1996; Schukken et al., 2011) y en la fase aguda de las infecciones con *S. aureus* y *E. coli* hay un incremento de los LT CD4+ (Grönlund, Johannisson, & Persson, 2006; Schukken et al., 2011). Los resultados de investigaciones sugirieron que el comportamiento de estas células depende del microorganismo o cepa involucrada en la infección (Schukken et al., 2011; Sordillo, 2005).

The National Mastitis Council (NMC) estableció en el año 2001 que RCS superiores a las 200.000 células/ml de leche obtenida de un cuarto marmario indican una probable infección o que el cuarto se está recuperando de una infección (solo se aprecia si se hace control lechero en forma repetida) (National Mastitis Council, 2001; Petzer et al., 2017b). Un estudio publicado recientemente, donde analizaron 345.467 muestras de leche compuesta y 89.635 muestras de cuarto, confirmó lo establecido por NMC en cuanto al umbral del RCS fijado para detectar infecciones mamarias en el cuarto (≥ 200.000 células/ml) y estableció el umbral del RCS para las muestras compuestas en igual o superior a 150.000 células/ml (Petzer et



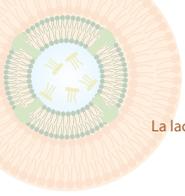
al., 2017a). En otro estudio, donde se validó el RCS como indicador de infecciones intramamarias (IIM) de acuerdo con los principales patógenos, se encontró que su sensibilidad fue del 88,2% en muestras de cuarto y del 84,2% en muestras compuestas; mientras que su especificidad fue baja, 57,7% y 52,8%, respectivamente. Adicionalmente, reportaron que cuando se tiene en cuenta los umbrales descritos anteriormente (≥ 200.000 células/ml en muestra de cuarto y ≥ 150.000 células/ml en muestra compuesta), el 20,5% de los cuartos y el 30,8% de las vacas infectadas con *S. aureus* podrían no ser detectadas por los bajos RCS que se presentan. Incluso, estos porcentajes podrían incrementar a 49 y 69%, respectivamente, si el umbral excede las 500.000 células/ml (Petzer et al., 2017b).

4.2.2. Mecanismos efectores de los fagocitos

Los macrófagos y los neutrófilos pueden reconocer y unirse a los microorganismos directamente, mediante los PRRs (Figura 2A), o indirectamente, por receptores que se unen a las opsoninas (fracción C3a y C5a del complemento o IgG), las cuales se pueden localizar en la superficie de estos (Figura 2B).

El fagocito se adhiere al microorganismo y lo internaliza dentro una vacuola conocida como fagosoma. Esta se fusiona posteriormente con los lisosomas para formar el fagolisosoma, donde finalmente la bacteria es eliminada mediante los diferentes mecanismos microbicidas que intervienen en el proceso, a saber: a) el estallido respiratorio, proceso donde se generan las especies reactivas del oxígeno, moléculas altamente oxidantes; b) la producción de especies reactivas del nitrógeno, especialmente del óxido nítrico o c) la descarga de enzimas proteolíticas dentro del fagolisosoma. Estos mecanismos en conjunto y bajo condiciones normales lesionan al microorganismo hasta su destrucción (Abbas et al., 2014) (Figura 2C).





La rápida y efectiva respuesta de los neutrófilos es clave para la resolución de la infección; sin embargo, en algunos trabajos se ha cuestionado su función fagocítica y bactericida por la ingestión de caseína y glóbulos de grasa que afectan los mecanismos microbicidas dentro del fagolisosoma y la membrana del fagocito (Mehrzad, Duchateau, & Burvenich, 2005; Thamavongsa et al., 2015). En un trabajo se observó una asociación positiva entre el porcentaje de grasa y el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de *S. aureus* aisladas en muestras de leche (Boerhout et al., 2016).

Los neutrófilos, además, usan Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET), también conocido como NETosis, proceso donde la célula libera todo su material nuclear (DNA y proteínas) y el de sus gránulos sobre el microorganismo (Swain et al., 2014) (Figura 2D).

4.2.3. Producción de citoquinas y quimioquinas

Una vez es reconocida la bacteria, se activan los mecanismos moleculares que promueven la expresión de genes que codifican para las principales citoquinas pro-inflamatorias: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina 1 β (IL-1 β) y la IL-6. La importancia de estas citoquinas dentro del proceso inflamatorio está dada por la capacidad que tienen para preparar a las células endoteliales para que permitan la migración de los leucocitos al sitio de la agresión (ej. TNF- α y la IL-1 β), para promover la fagocitosis en neutrófilos (ej. TNF- α) y estimular la producción de reactantes de fase aguda (ej. IL-1 β e IL-6) (Fu et al., 2013). La activación de los TLRs en condiciones normales desencadena la expresión de los genes que codifican para las citoquinas por la vía dependiente de la proteína adaptadora MyD88 y del factor nuclear κ B (NF- κ B).

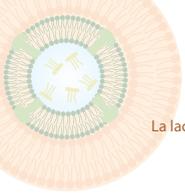
Se ha observado en diferentes estudios que *S. aureus* tiene la capacidad de bloquear o inhibir la activación del NF- κ B y, por consiguiente, alte-



rar la magnitud y tiempo de respuesta, especialmente de las citoquinas TNF- α y la IL-1 β . En otros patógenos, como *E. coli*, sucede lo contrario: se ha descrito una fuerte y rápida respuesta (Yang et al., 2008; Günther et al., 2011; Lara-Zárate et al., 2011). No obstante, algunos autores observaron en las infecciones con *S. aureus* la expresión de estas citoquinas en ausencia del factor, sugiriendo la participación de vías independientes, tales como la proteína de activación 1 (AP-1) y el elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE). En otros casos, lo que se obtuvo fue transcripción de los genes después del reto, pero no hubo traducción (Kim et al., 2011; Bougarn et al., 2010). Recientemente se reportó la presencia de IL-17 en leche de animales infectados con *E. coli*, una interleuquina producida por los linfocitos TH17 y con capacidad de estimular la producción de quimioquinas involucradas en la migración de neutrófilos y de incrementar la producción de defensinas (Abbas et al., 2014; Herry et al., 2017; Blum et al., 2017) (Figura 2E).

Simultáneamente a la producción de las citoquinas, se inicia la producción de quimioquinas, importantes moléculas involucradas en la migración de leucocitos (neutrófilos, macrófagos, linfocitos) desde la sangre hasta el sitio de la infección. La palabra quimioquina es una contracción de citoquina quimiotáctica. Estas moléculas cumplen dos funciones importantes en la inflamación: incrementar la adhesión de los leucocitos al endotelio y direccionar la migración de éstos hacia el sitio de la infección (Abbas et al., 2014). La evaluación del transcriptoma de las CEM después de retadas con *E. coli* demostró que este tipo de célula puede expresar la mayoría de las quimioquinas (Günther et al., 2009). Una de las quimioquinas más estudiadas a nivel mamario es la CXCL8 (IL-8) y se ha demostrado su expresión después de la infección con diferentes patógenos tanto en tejido como en la leche (Bannerman, 2009). La eficaz migración de los neutrófilos a la glándula mamaria es consecuencia de





la rápida y abundante producción de la CXCL8 por parte de los macrófagos y las CEM. El gen que codifica para la CXCL8 es uno de los que primero se expresa en las CEM después de un estímulo inflamatorio (Abbas et al., 2014; Schukken et al., 2011) (Figura 2F).

Algunas de las quimioquinas detectadas a niveles significativos en diferentes estudios son: la CCL2 y CCL5, responsables del reclutamiento de leucocitos en general; la CCL20, involucrada en la migración de linfocitos TH17, y la CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL6 y CXCL8 (IL-8), encargadas de la migración de los neutrófilos (Kiku et al., 2016; Rainard et al., 2008; Schukken et al., 2011). En términos generales, lo que ha demostrado la evidencia es que estos factores se expresan a niveles más bajos en *S. aureus* que en *E. coli*. Incluso su expresión puede ser patógeno-específico (Schukken et al., 2011; Günther et al., 2017); por ejemplo, la quimioquina CCL20 se expresa fuertemente en infecciones con *E. coli*, pero no en las infecciones con *S. aureus* (Günther et al., 2017). Esta quimioquina está involucrada en la migración de los linfocitos TH17, un tipo de célula que parece desempeñar un papel importante en las infecciones con este bacilo, dado que desencadena una respuesta para bacterias extracelulares mediada por neutrófilos (Abbas et al., 2014; Herry et al., 2017; Blum et al., 2017).

4.2.4. Producción de péptidos y proteínas antimicrobianas

La producción de péptidos o proteínas con acción antimicrobiana es otro mecanismo de defensa que poseen los leucocitos, así como las células epiteliales, endoteliales y de mucosas (Alva et al., 2012). Unas de las moléculas más estudiadas son las defensinas, pequeños péptidos catiónicos (29 – 34 aminoácidos) que tienen como principal función causar daño directo sobre el microorganismo al alterar su membrana. Se conocen tres familias de defensinas: las α , β y θ ; las β -defensinas son las más estudiadas en mamíferos (Gurao, Kashyap & Singh, 2017). A estas molé-



culas se les ha demostrado su acción frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, virus, hongos y parásitos unicelulares (Brogden, 2005).

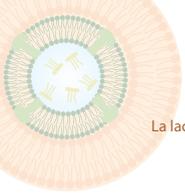
Las defensinas interactúan con la membrana del microorganismo blanco mediante atracción electrostática (péptido catiónico y la membrana aniónica) o a través de receptores presentes en las membranas. Posteriormente, el péptido se inserta en la membrana, de manera que la permeabiliza y ocasiona la lisis del microorganismo por un choque osmótico. Además, se ha reportado que los péptidos antimicrobianos pueden estimular hidrolasas que ayudan a lesionar la pared celular (Gurao et al., 2017) (Figura 2G).

De las 58 β -defensinas que se han predicho *in silico*, solo unas pocas se han estudiado a nivel de glándula mamaria. Diferentes trabajos han demostrado la expresión de algunos genes que codifican para estos péptidos y como respuesta se producen las IIM, las CEM y algunas CS en neutrófilos y macrófagos; estas, a su vez, son las principales fuentes de defensinas en este órgano (Meade et al., 2014; Gurao et al., 2017).

Algunas de las β -defensinas reportadas en glándula mamaria son el péptido antimicrobiano lingual (LAP), el péptido antimicrobiano traqueal (TAP), la β -defensina bovina 1 (DEFB1) —también conocida como β -defensina de neutrófilo bovino 1 (BNBD1)—, la DEFB3 (BNBD3), DEFB4 (BNBD4), DEFB5 (BNBD5), DEFB10 y la DEFB103 (Gurao et al., 2017).

En un estudio en el que se infectó la glándula mamaria de un grupo de vacas con *S. aureus* se evidenció expresión de los genes que codifican para BNBD4 y BNBD5 en cuatro tipos de tejidos (alveolar, ductal, cisterna y del canal), si bien hubo mayor expresión en el tejido alveolar (Whelehan et al., 2011). En otro trabajo donde se retaron células endoteliales bovinas con *S. aureus* y con LPS, se observó expresión de LAP, DEFB1 y





DEFB4, la cual estuvo regulada por la producción autocrina de TNF- α (Murillo et al., 2012). Los resultados obtenidos en una investigación reciente sugieren que los péptidos antimicrobianos no fueron importantes en el control del crecimiento de *E. coli* en leche (Herry et al., 2017).

Al igual que las defensinas, a ciertas proteínas de fase aguda se le ha atribuido acción antimicrobiana. Una de las más importantes en bovinos es el amiloide sérico A (SAA), al que se le ha identificado actividad antibacteriana directa. Esta proteína aumenta significativamente tanto en el suero como en la leche de animales infectados con *S. aureus* (Weber et al., 2006; Eckersall et al., 2006).

Otra de las proteínas solubles de importancia en la respuesta innata es la lactoferrina, una glicoproteína que pertenece a la familia de las transferrinas y que cumple un papel fundamental en la prevención de IIM (Shimazaki & Kawai, 2017). La principal fuente de lactoferrina en la glándula mamaria son las CEM y en menor proporción los leucocitos PMN (Huang et al., 2012). Durante el periodo de no lactancia (periodo seco) se ha detectado altas concentraciones de lactoferrina tanto en la cisterna de la glándula como en la del pezón; durante la lactancia se pueden encontrar fluctuaciones en su concentración (Gurao et al., 2017).

Es bien conocido que la lactoferrina puede tener actividad bacteriostática y bactericida. La quelación del hierro es el principal mecanismo con el que la lactoferrina le causa daño a las bacterias: las desprovee de una molécula fundamental para su desarrollo (Pereyra, Dallard & Calvino, 2014). Además de este mecanismo, la lactoferrina también actúa generando la oclusión de porinas de la superficie bacteriana, la inhibición de formación de biopelículas y la interacción con enzimas líticas como la lisozima. Tal se ha identificado con las citoquinas, la expresión de lactoferrina, así como la sensibilidad o resistencia frente a esta, puede variar



según el patógeno. De acuerdo con algunos resultados de trabajos, se ha observado que la expresión de la lactoferrina en respuesta a las infecciones con *E. coli* es superior a la identificada con *S. aureus* si bien *E. coli* parece mostrar más resistencia a su acción que *S. aureus*, (Wellnitz & Bruckmaier, 2012; Shimazaki & Kawai, 2017).

En contraste con lo anterior, hay reportes acerca del efecto inhibitorio que puede ejercer sobre la respuesta inflamatoria en las mastitis causadas por Gram negativos, debido a la capacidad que tiene esta glicoproteína de unirse al LPS de las bacterias. Se ha sugerido que el complejo lactoferrina-LPS inhibe la activación de los TLR4 al bloquear su interacción con los LPS, lo que puede llevar a la supresión inmune (Latorre et al., 2012; Puddu et al., 2010; Shimazaki & Kawai, 2017).

4.2 Inmunidad adaptativa

Además de los mecanismos efectores de la inmunidad innata con los que la glándula mamaria enfrenta a los microorganismos invasores, también se han descrito componentes de la inmunidad adaptativa durante la respuesta. Los únicos componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y los anticuerpos (Abbas et al., 2014). En contraste con la inmunidad innata, esta respuesta se caracteriza por la especificidad y la capacidad de generar memoria inmunológica. Entender este último mecanismo se ha convertido en un verdadero reto para los investigadores y una limitante para generar vacunas que protejan a la glándula mamaria de infecciones (Schukken et al., 2011).

La evidencia ha demostrado que la inmunidad protectora de la glándula mamaria es de vida corta y generalmente desaparece en semanas (Petzl et al., 2017; Schukken et al., 2011). En humanos se ha observado que dependiendo del tipo de linfocito B (LB) activado —marginal o folicular— y



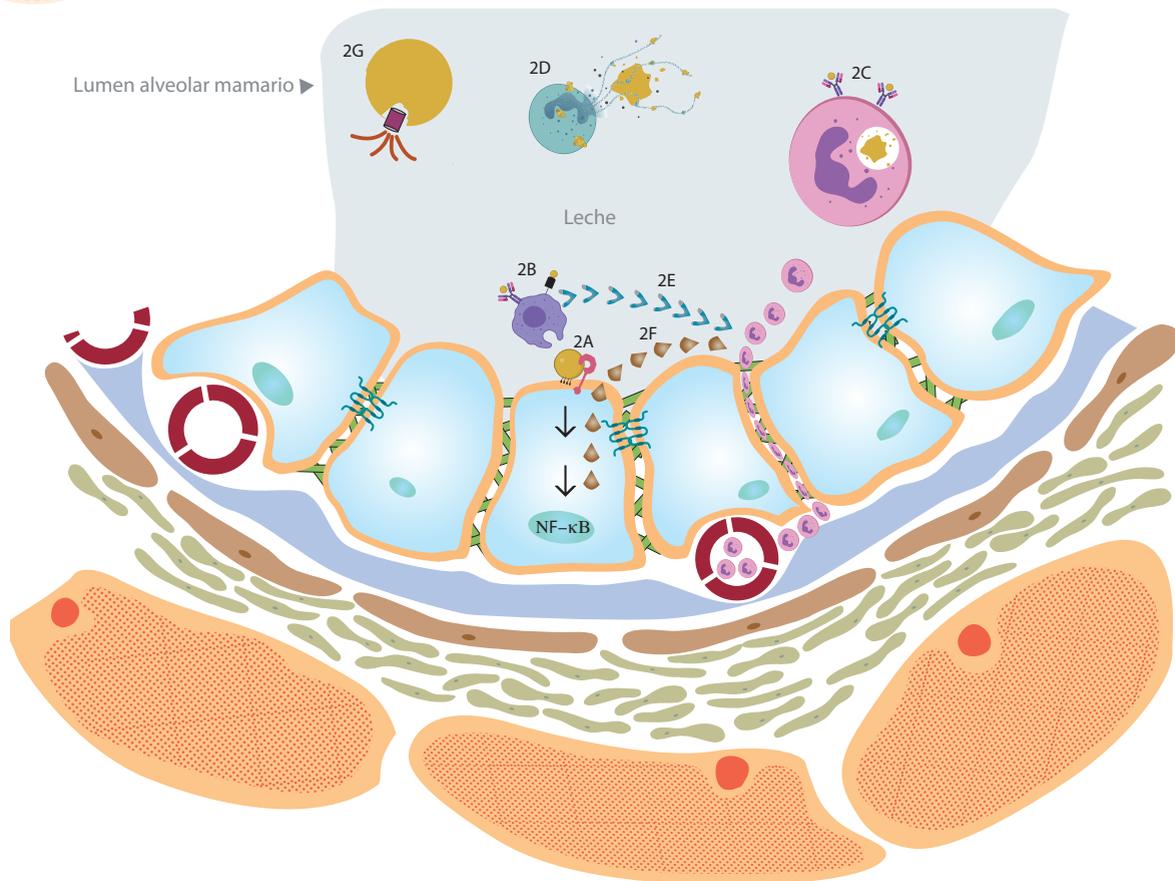


Figura 2. Principales mecanismos de respuesta de la inmunidad innata y adaptativa con los que la glándula mamaria enfrenta las infecciones: **2A.** reconocimiento de la bacteria; **2B.** opsonización por anticuerpos y complemento; **2C.** fagocitosis; **2D** NETosis; **2E** y **F.** producción de citoquinas y quimioquinas; **2G.** péptidos o proteínas antimicrobianas.

Fuente: G Torres 2019

Convenciones

 <i>Staphylococcus aureus</i>	 CWA	 TLR4
 TLR2	 $\alpha 5\beta 1$	 Fibronectina
 <i>S. aureus</i> PIA independiente - <i>bap</i> +	 NLR	 <i>S. aureus</i> PIA dependiente - <i>ica</i> +

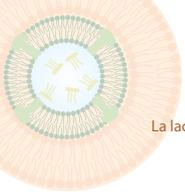


de la naturaleza del Antígeno (Ag) —proteico o lipopolisacáridos (LPS)— se desencadena una respuesta humoral que perdura o no en el tiempo. Si se activan los LB marginales o el Ag es diferente a una proteína, se generarán células plasmáticas (CP) de corta vida que van a producir Anticuerpos (Ac) de baja afinidad; mientras que, si se activan los LB foliculares o el Ag es proteico, se generan CP de larga vida que producirán Ac específicos, los cuales pueden durar por meses o años después del estímulo y permiten reaccionar rápidamente contra el Ag si vuelve a entrar (Abbas et al., 2014).

Los anticuerpos son un componente fundamental de la inmunidad adquirida. Sus funciones son neutralizar, activar el complemento y opsonizar (Abbas et al., 2014). Sin embargo, como algunas bacterias pueden invadir eficientemente las células epiteliales, así como formar biopelículas, cápsulas o quistes intramamarios, se ha propuesto que este tipo de respuesta no es suficiente ni efectiva para enfrentar estas infecciones, pues los microorganismos quedan fuera del alcance de las inmunoglobulinas (Grönlund et al., 2006; Atalla et al., 2010).

La IgG es el isotipo predominante en leche de bovinos sanos, específicamente el subtipo IgG1, que alcanza niveles hasta de 100 veces más altos que la IgG2 (Pastoret, 1998). Las principales funciones de la IgG son opsonizar y activar el complemento, por lo que cumplen un papel importante en la eliminación de los microorganismos mediante fagocitosis (Abbas et al., 2014). En los estudios donde se ha estimulado el sistema inmune de la glándula mamaria mediante diferentes vacunas o inmunógenos, se ha observado el incremento de la IgG1 y de la IgG2 tanto en sangre como en leche (Schukken et al., 2011). El incremento de la IgG2 se ha relacionado con el aumento de los neutrófilos, dado que son estos fagocitos las células con mayor presencia de receptores para la inmunoglobulina (Boerhout et al., 2016; Herry et al., 2017). Incluso algunos reportes muestran que la elimi-





nación de coliformes en glándula mamaria por medio de PMN fue óptima cuando los niveles de IgG2 incrementaron dentro de las cuatro horas posteriores a la IIM, lo cual demuestra la importancia de esta inmunoglobulina en la respuesta frente a ese grupo bacteriano (Schukken et al., 2011).

Se ha sugerido que el aumento de la IgG en leche se debe a una pérdida de la integridad de la barrera hemato-láctea, que permite el paso de las inmunoglobulinas desde la sangre a la leche. (Lehmann, Wellnitz, & Bruckmaier, 2013).

Una de las vacunas para mastitis bovina más comercializada es la que incluye la cepa J5 de *E. coli* y la cepa SP140 de *S. aureus*, ambas inactivadas. Los resultados en los animales infectados con *S. aureus* muestran principalmente una respuesta TH2, caracterizada por el incremento de la IgG1. Con *E. coli*, mediada por una respuesta TH1, se ha observado por el contrario un incremento de la IgG2 (Piepers et al., 2017; Schukken et al., 2011). Además, se ha demostrado con otros inmunógenos que la intensidad de la respuesta puede ser dosis y vía dependiente; por ejemplo, en un estudio donde probaron diferentes vías de inmunización contra *S. aureus* se observó que la mejor vía de aplicación del inmunógeno fue a nivel del ligamento suspensorio, pues se determinó una diferencia en la respuesta y mayores títulos de IgG1 e IgG2 en suero y leche con respecto a las otras vías (intranasal, intramuscular e intramamaria) (Boerhout et al., 2015).

5. Mecanismos de patogenicidad y evasión de la respuesta inmune

5.1 *Escherichia coli*

Las infecciones con *E. coli* generalmente son autolimitadas y controladas por la respuesta inmune; aunque algunas pueden persistir y resultar en



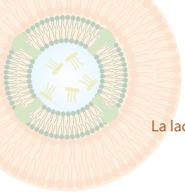
mastitis crónica (Blum, Heller, & Leitner, 2014; Gomes et al., 2016). La severidad de la mastitis generada por este bacilo se le ha atribuido principalmente a factores del animal; no obstante, hay evidencia que demuestra que la severidad o intensidad de la respuesta es cepa dependiente (Blum et al., 2017). Un estudio en el que se compararon a nivel genotípico y fenotípico cuatro cepas de *E. coli*, dos causantes de mastitis aguda (VL2874 y P4), una de mastitis persistente (VL2732) y una aislada del ambiente (K71), se concluyó que las cepas aisladas de mastitis presentan potencial patogénico con respecto a la ambiental. Se encontraron marcadores genómicos asociados a citotoxicidad en las cepas causantes de mastitis aguda; mientras que los asociados a invasión intracelular se identificaron en la cepa responsable de mastitis persistente. A nivel fenotípico se encontró que la cepa persistente fue más versátil en cuanto a metabolismo de nutrientes con respecto a las otras cepas patógenas evaluadas (Blum et al., 2015; Blum et al., 2014; Gomes et al., 2016; Blum et al., 2017).

5.2 *Staphylococcus aureus*

El modelo infeccioso y los factores de virulencia de *S. aureus* han sido más estudiados, por lo que en este punto se hace una descripción más detallada de las estrategias que puede emplear el patógeno para responder y alterar los componentes del sistema inmune mamario.

Las mastitis causadas por *S. aureus* generalmente evolucionan a infecciones crónicas difíciles de erradicar; hecho que se le ha atribuido a la capacidad que posee el patógeno para evadir y manipular la respuesta inmune a través de los múltiples factores de virulencia reportados (Günther et al., 2017). Los mecanismos con los que *S. aureus* enfrenta el sistema inmune de la glándula se pueden dividir en dos categorías: los que le permiten pasar desapercibido frente a los elementos de alarma





y aquellos que le ayudan a escapar o manipular el sistema cuando es reconocido y atacado.

En la primera categoría (Figura 3A), fundamentales para establecer la infección, se pueden incluir los mecanismos de invasión celular, la formación de cápsula y la producción de proteínas tipo superantígeno de los *Staphylococcus* (*Staphylococcal Superantigen-Like* - SSLs). *S. aureus* se ha considerado un microorganismo extracelular; sin embargo, su habilidad de invadir y sobrevivir dentro de varios tipos de células ha sido evidenciada en numerosos estudios (Finlay & Cossart, 1997; Kim et al., 2011). Invadir las células le permite a la bacteria quedar fuera del alcance de mecanismos efectores importantes de la respuesta inmune, tales como la fagocitosis y los anticuerpos. Varios elementos se han relacionado con la capacidad de invasión, entre estos, la expresión de receptores e integrinas, el bloqueo o inactivación de NF- κ B (Figura 3A-1), el fenotipo conocido como colonias pequeñas variantes (Small Colony Variants - SCV) (Figura 3A-2), la presencia de polisacáridos capsulares y la formación de biopelícula. Algunos estudios demostraron que el bloqueo de la integrina $\alpha 5\beta 1$ reduce significativamente la invasión intracelular, al igual que la expresión de la Proteína asociada a la biopelícula (*Biofilm-Associated Protein* – Bap) y la presencia de polisacáridos capsulares (Valle et al., 2012b; Pöhlmann-Dietze et al., 2000; Bardiau et al., 2014). Por el contrario, se ha observado que cuando la bacteria presenta el fenotipo de SCV es más eficiente para ingresar que el fenotipo normal (Atalla et al., 2008) (Figura 3A-2).

Con respecto a la cápsula, se han descrito alrededor de 11 polisacáridos capsulares, el CP5 y el CP8 son los más frecuentes tanto en humanos como en bovinos. Esta estructura le confiere a la célula bacteriana protección frente al reconocimiento y la fagocitosis, debido a que no per-



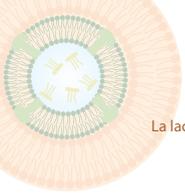
mite la unión de PRRs y opsoninas a sus moléculas blanco (Figura 3A-3). Las SSLs pueden variar entre cepas, sin embargo, la evidencia indica que los genes *ssl1*, *ssl2*, *ssl3*, *ssl11*, *ssl12*, *ssl13*, *ssl14* son frecuentes entre todos los aislados. Uno de los polisacáridos más importantes es el SSL3, dado que puede unirse a los TLR2 expresados en las células epiteliales e inmunes para bloquear el reconocimiento de la bacteria (Yokoyama et al., 2012; Thammavongsa et al., 2015) (Figura 3A-4).

En cuanto a los mecanismos que componen la segunda categoría (Figura 3B), claves para mantener la infección después de reconocida, se pueden dividir en cinco grupos: i) los factores que intervienen con la quimioatracción y migración de neutrófilos; ii) los factores que inhiben el accionar de los neutrófilos y del complemento; iii) los factores de destrucción celular; iv) los factores con los que se aísla del entorno y v) los factores que alteran la inmunidad adaptativa.

i) Factores que intervienen con la quimioatracción y migración de neutrófilos

El *Staphylococcus aureus* puede afectar estos procesos, fundamentales en el control de la infección, a través de la secreción de algunas SSLs o por proteínas inhibitorias de la quimioatracción (*Chemotaxis Inhibitory Protein of S. aureus* - CHIPS). El patógeno puede alterar la generación de las moléculas C3a y C5a del complemento, importantes quimiotácticos de células fagocíticas, al no permitir que se active el sistema fuente de estos componentes. Por ejemplo, la SSL7 y la SSL10 (Figura 3B-1) tienen la capacidad de secuestrar inmunoglobulinas mediante la unión a la fracción Fc para que no puedan activar el complemento por la vía clásica o puede bloquear las tres vías al inactivar directamente los factores C3 y C5 (Thammavongsa et al., 2015). En caso que se activen las vías del complemento y se produzca el quimioatrayente C5a, la bacteria





puede bloquear su función mediante las CHIPS (Figura 3B-2) (Postma et al., 2004). La adhesión al endotelio y migración de los neutrófilos puede ser alterada por la SSL5 y la SSL11, quienes se adhieren a la glicoproteína PSGL-1, presente en las membranas de los fagocitos, y no permiten su unión con la P-selectina, molécula expresada en el endotelio del huésped y clave para la adhesión y posterior migración de los leucocitos al sitio de la infección (Bestebroer et al., 2007).

ii) Factores que inhiben el accionar de los neutrófilos y del complemento

La sola fagocitosis de *S. aureus* no garantiza su eliminación, pues la bacteria posee varias estrategias con las que puede alterar los mecanismos efectores de este proceso (Figura 3B-3). Frente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno, emplea elementos antioxidantes, tales como el pigmento estafloxantina y la catalasa; mientras que contra el superóxido utiliza las superóxido dismutasas (SodA and SodM) (Liu et al., 2005; Cosgrove et al., 2007; Karavolos et al., 2003). La bacteria produce flavohemoglobina y Lactato deshidrogenasa como respuesta al óxido nítrico. Incluso puede inhibir la desgranulación al incrementar la concentración extracelular de Adenosina mediante la enzima catalítica de superficie Adenosin sintetasa A (AdsA). La Adenosina producida se une a su receptor en la membrana del fagocito y desencadena una cascada de señalización anti-inflamatoria que bloquea la liberación de los gránulos dentro del fagosoma (Thammavongsa et al., 2009). Otra de las estrategias es modificar químicamente el peptidoglicano (acetilación) para generar resistencia frente a la lisozima y péptidos antimicrobianos (Bera et al., 2005). Con respecto a las NET, esta bacteria las evade mediante DNasas, enzimas que le permiten degradar este material antes de que sufra daño (Thammavongsa et al., 2013) (Figura 3B-4).



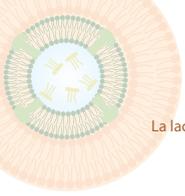
Además de la SSL7 y el SSL10, descritas anteriormente, *S. aureus* presenta otros mecanismos con los que también puede afectar el sistema del complemento. La Aureolisina (Aur), una metaloproteasa dependiente de Zinc y secretada por la bacteria, puede degradar el factor C3, por lo que no se van a generar las fracciones encargadas de la quimioatracción (C3a y C5a), la opsonización (C3b y C5b) y el complejo de ataque a la membrana, objetivo final de este sistema (Laarman et al., 2011) (Figura 3B-5). Otra manera de afectar dicho sistema es inhibiendo la C3 convertasa (C3c) por medio del inhibidor del complemento (SCIN) que en condiciones normales es la responsable de fragmentar C3 en C3a y C3b dos productos claves en el proceso. Sin embargo, al igual que con la Aur, el mecanismo de *S. aureus* bloquea todo lo que dependa de la activación y correcto funcionamiento de estas moléculas (Rooijackers et al., 2005) (Figura 3B-6).

La destrucción de diferentes tipos de células inmunes está mediada básicamente por toxinas, especialmente, por las β -toxinas formadoras de poro (β -PFTs) (Figura 3B-7). Las más representativas de este grupo son la α -Hemolisina (Hla) y las leucocidinas. Todas las cepas pueden producir al menos tres leucocidinas (Luk): γ -Hemolisina AB (HlgAB), HlgCB y la Leucocidina AB (LukAB); mientras que la producción de la LukED es cepa dependiente. La Hla forma un anillo heptamérico y las Luk uno octamérico que contienen un poro central, con el cual debilitan la membrana de la células blanco hasta causarles lisis osmótica (Heuck et al., 2001; Miles et al., 2002).

iii) Factores que la aíslan y protegen del entorno

La formación de biopelícula y de abscesos son los principales representantes de este grupo (Figura 3B-8). La biopelícula es considerada un factor de virulencia que le confiere ventajas a los patógenos causantes de mastitis, debido a que les facilita su persistencia en glándula mamaria. De hecho, diferentes autores en los últimos años se han interesado en





la formación de biopelícula, pues esta estructura le permite a la bacteria evadir la respuesta inmune e incrementar la tolerancia frente a los diferentes agentes antimicrobianos, por lo que estas infecciones serán más difíciles de eliminar (Gomes et al., 2016). Se ha descrito que alrededor del 40% de las mastitis corresponden a casos que no resolvieron con los tratamientos antibióticos aplicados (Hillerton & Kliem, 2002). Cuando las bacterias forman biopelícula pueden tolerar 10 veces o más la concentración de antibióticos requerida para eliminarla en condiciones normales y tampoco son accesibles a la opsonización y fagocitosis, procesos que son fundamentales para la eliminación de las infecciones mamarias (Donlan & Costerton, 2002; Gomes et al., 2016).

Las biopelículas son ampliamente definidas como un grupo de células inmersas en una matriz que estas mismas forman. La formación de biopelícula es un proceso dinámico e inicia con la adhesión de la bacteria a la superficie viva, que en este caso serían las CEM, mediante las diferentes proteínas de superficie descritas. Posteriormente, las bacterias se multiplican y forman varias capas de células. Al tiempo en que estas se multiplican, se van generando los componentes que conforman la matriz en la cual quedarán inmersas las células bacterianas y demás material proveniente del medio ambiente. Además, durante la formación de la biopelícula se crean en su interior canales por donde van a fluir elementos indispensables para la supervivencia de las bacterias, tales como el oxígeno, metabolitos y nutrientes. Conformada la biopelícula, las bacterias allí contenidas generan una ruptura de la estructura mediante enzimas líticas para poder liberarse y colonizar otras áreas (Gomes et al., 2016; McCarthy et al., 2015).

El *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos más aislados de las IIM a nivel mundial y una de las bacterias con mayor capacidad de formar

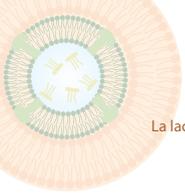


biopelícula sobre superficies vivas e inertes (Keefe, 2012; Gomes et al., 2016). Esta bacteria puede formar dos tipos de biopelículas: una donde la matriz tiene como base el polisacárido de adhesión intercelular (PIA) y la otra a base de proteínas. La primera es conocida como dependiente de PIA y codificada por el operón *ica*; la segunda es conocida como independiente de PIA, codificada por gen *bap* y asociada también a la meticilino resistencia (McCarthy et al., 2015).

Entre los mecanismos de formación de biopelícula el más estudiado ha sido el dependiente de PIA. En este se produce básicamente el polisacárido poli-N-acetilglucosamina (PNAG), también conocido como PIA, el cual es codificado por el operón *ica*. El operón está compuesto por cinco genes: cuatro (A, D, B, C) codifican para las proteínas involucradas en la biosíntesis y exportación de PIA a la superficie de la pared bacteriana, el quinto (R) codifica para un regulador transcripcional. Las proteínas codificadas por los genes *icaA*, *icaD* e *icaC* corresponden a proteínas transmembrana. La proteína producto del gen *icaA* tiene actividad glicosiltransferasa y es la responsable de la síntesis del polisacárido; en este proceso también interviene el producto del gen *icaD*. Inmediatamente el polisacárido alcanza un tamaño máximo de 20 residuos, el producto derivado del gen *icaC* lo transloca a la superficie celular; sin embargo, para que el polisacárido formado se desprenda de la bacteria y quede totalmente sobre su superficie, este debe ser deacetilado por el producto del gen *icaB* (O’Gara, 2007). El PIA formado queda con una carga neta positiva que promueve la agregación intercelular y la unión de la bacteria a la superficie inerte (Rohde et al., 2010). La mayoría de las cepas de importancia clínica son portadoras del operón *ica* (Fowler et al., 2001; Cucarella et al., 2004).

Uno de los primeros reportes de formación de biopelícula independiente de PIA en *S. aureus* fue realizado precisamente en un aislado de





mastitis bovina, en el cual se identificó Bap (Cucarella et al., 2001). Esta proteína tiene un tamaño de 2.276 aminoácidos y permite la unión a las superficies y la adhesión intercelular.

Bap es codificada por el gen *bap*, el cual hace parte de un transposón que se inserta en la isla de patogenicidad SaPI_{bov2}; su inserción incluso reemplaza algunos genes que codifican para toxinas (Cucarella et al., 2004). La evidencia sugiere que el gen *bap* se puede transmitir entre cepas mediante transferencia horizontal de genes (Tormo et al., 2005). A la fecha, el gen *bap* solo se ha encontrado en cepas aisladas de bovinos y su frecuencia entre las cepas puede variar por regiones o países. Un estudio demostró que cuando las cepas portan este genotipo son menos invasivas, debido a que Bap bloquea la interacción de las FnBP con su ligando (fibronectina), proceso fundamental para que la bacteria pueda ingresar a la CEM (Cucarella et al., 2002; Valle et al., 2012b).

Otro de los mecanismos que se ha relacionado con la formación de biopelícula independiente de PIA es la Meticilino resistencia en *S. aureus* (McCarthy et al., 2015). Algunos estudios han mostrado que las cepas resistentes a la Meticilina expresan el fenotipo proteico; las cepas sensibles presentan el fenotipo PIA dependiente (McCarthy et al., 2015). Se ha demostrado que en cepas de *S. aureus* Meticilino resistentes el operón *ica* puede estar presente y expresado, pero el PIA no se produce (O'Neill et al., 2007). El operón *ica* en estos casos puede estar reprimido más de 300 veces en comparación con las cepas Meticilino sensibles, lo que conlleva a la formación de una biopelícula a base de proteínas.

Por otra parte, los abscesos son comunidades bacterianas que se protegen dentro de una pseudocápsula formada a base de depósitos de fibrina y rodeada de capas de células inmunes muertas. Esta estructura evita la entrada de fagocitos y promueve la supervivencia dentro de la lesión.

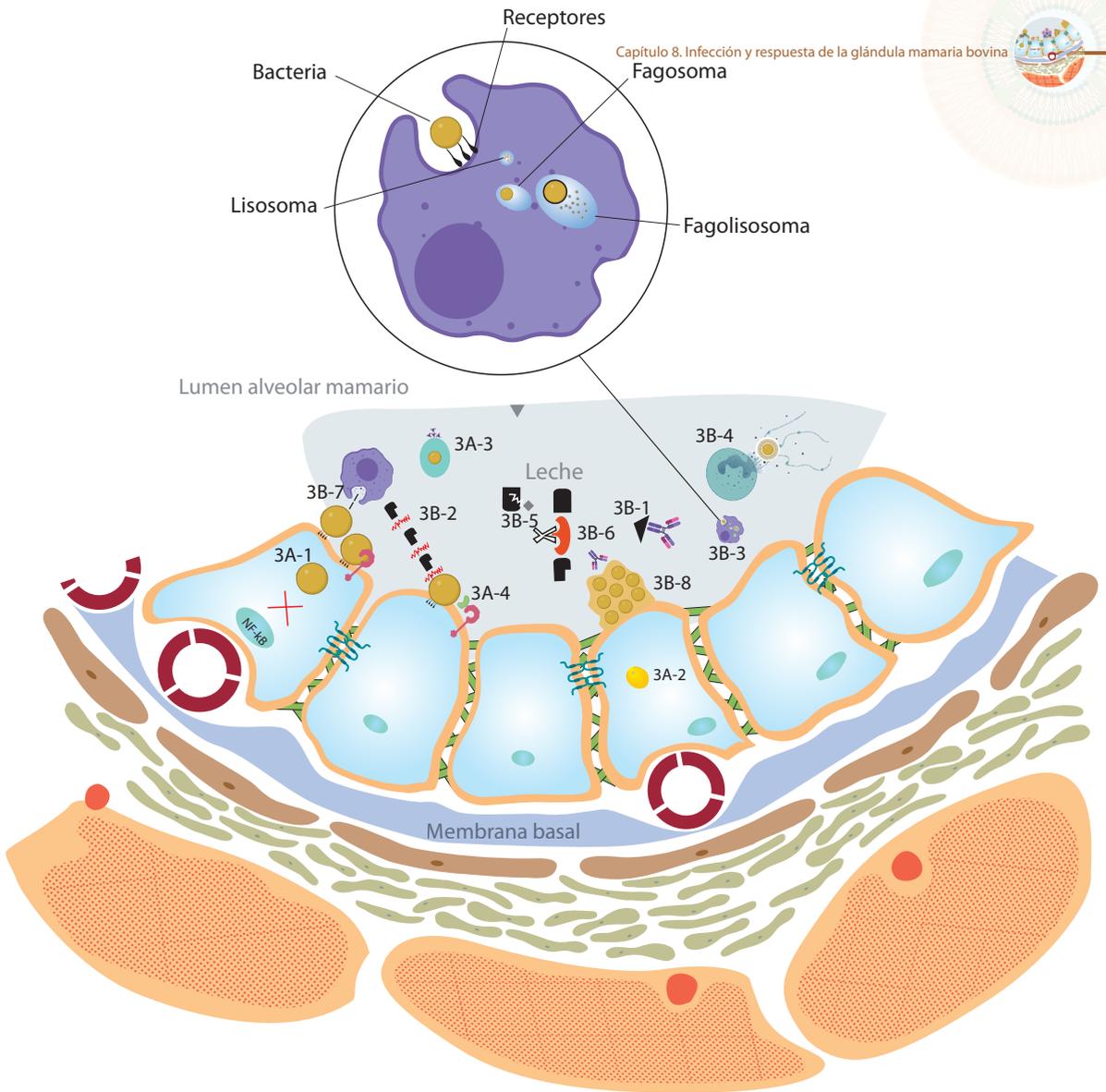


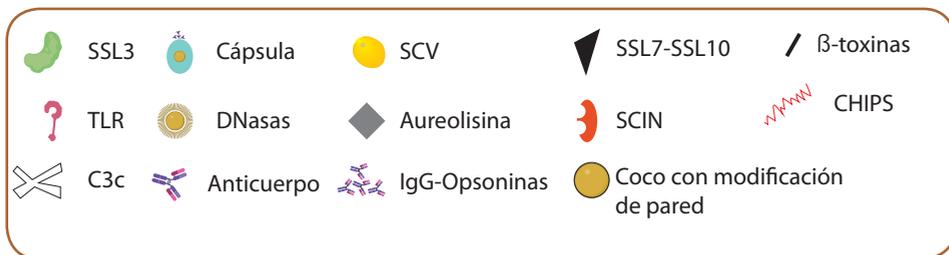
Figura 3. 3A. Mecanismos que emplean las bacterias para evadir o retrasar su reconocimiento por parte del sistema inmune: invasión celular (**3A-1**); fenotipo SCV (**3A-2**); presencia de cápsula (**3A-3**); producción de SSLs (**3A-4**). **3B.** Mecanismos con los cuales las bacterias evaden o manipulan la respuesta inmune desencadenada después de reconocidas: alteración de la quimioatracción y migración de los neutrófilos (**3B-1** y **3B-2**); inhibición de la fagocitosis y del complemento (**3B-3**, **3B-4**, **3B-5** y **3B-6**); destrucción de células (**3B-7**); aislamiento del entorno (biopelículas) (**3B-8**).

Fuente: G Torres 2019





Convenciones



Su formación está mediada por la Deoxiadenosina generada durante la degradación de las NET a través de nucleasas secretadas por la bacteria. Esta Deoxiadenosina desencadena la apoptosis de los macrófagos que rodean al patógeno, por lo que las células muertas terminan aislándola de su entorno (Thammavongsa et al., 2013).

iv) Factores que alteran la inmunidad adaptativa

El *Staphylococcus aureus* también puede interferir con los mecanismos efectores de la inmunidad adaptativa. En este proceso participan básicamente superantígenos y la Proteína A (SpA). SpA, expresada y secretada por todas las cepas de interés clínico, tiene la capacidad de unirse tanto a la fracción Fc como a la fracción Fab de las inmunoglobulinas. De acuerdo a la evidencia, cuando se une a la fracción Fab de la IgM de superficie de los Linfocitos B desencadena apoptosis, mientras que, cuando sucede en los plasmoblastos, el resultado es la producción de anticuerpos no específicos debido a que altera la hipermutación somática (Goodyear & Silverman, 2004; Thammavongsa et al., 2015). Por otra parte, la respuesta de los LT también se ve afectada por superantígenos. En este caso, los superantígenos interfieren entre las células presentadoras de antígenos y los LT ayudadores, pues se unen a los receptores involucrados en esta, al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II) y a los receptores de las

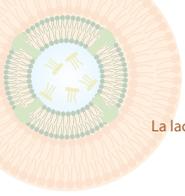


células T (TCR), lo que desencadena una respuesta no específica para el patógeno (Jardetzky et al., 1994; Thammavongsa et al., 2015).

Bibliografía

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology* (Eighth). Elsevier.
- Alva, N., Téllez, A., Sagrero, E., López, J., & Ochoa, A. (2012). Expression of antimicrobial peptides by bovine endothelial cells. *Cellular Immunology*, *280*(1), 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.016>
- Atalla, H., Gyles, C., Jacob, C., Moisan, H., Malouin, F., & Mallard, B. (2008). Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathogens and Disease*, *5*(6), 785-799. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0110>
- Atalla, H., Wilkie, B., Gyles, C., Leslie, K., Mutharia, L., & Mallard, B. (2010). Antibody and cell-mediated immune responses to *Staphylococcus aureus* small colony variants and their parental strains associated with bovine mastitis. *Developmental and Comparative Immunology*, *34*(12), 1283-1290. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.07.005>
- Bannerman, D. (2009). Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science*, *87*(13 Suppl), 10-25. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1187>
- Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J., & Ote, I. (2014). Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, *169*(1-2), 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.010>
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., & Götz, F. (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, *55*(3), 778-787. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04446.x>
- Bestebroer, J., Poppelier, M., Ulfman, L., Lenting, P., Denis, C., van Kessel, K., de Haas, C. (2007). Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. *Blood*, *109*(7), 2936-2943. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-015461>



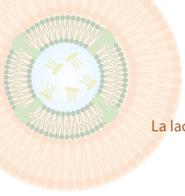


- Blum, S., Heller, E., Jacoby, S., Krifucks, O., & Leitner, G. (2017). Comparison of the immune responses associated with experimental bovine mastitis caused by different strains of *Escherichia coli*. *The Journal of Dairy Research*, 84(2), 190-197. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000206>
- Blum, S., Heller, E., & Leitner, G. (2014). Long term effects of *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 201(1), 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.008>
- Blum, S., Heller, E., Sela, S., Elad, D., Edery, N., & Leitner, G. (2015). Genomic and Phenomic Study of Mammary Pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*, 10(9), e0136387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136387>
- Boerhout, E., Koets, A., Vernooij, J., Mols-Vorstermans, T., Nuijten, P., Rutten, V., Eisenberg, S. (2016). Reisolation of *Staphylococcus aureus* from bovine milk following experimental inoculation is influenced by fat percentage and specific immunoglobulin G1 titer in milk. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4259-4269. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10648>
- Boerhout, E., Vrieling, M., Benedictus, L., Daemen, I., Ravesloot, L., Rutten, V., Eisenberg, S. (2015). Immunization routes in cattle impact the levels and neutralizing capacity of antibodies induced against *S. aureus* immune evasion proteins. *Veterinary Research*, 46, 115. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0243-7>
- Bougarn, S., Cunha, P., Harmache, A., Fromageau, A., Gilbert, F., & Rainard, P. (2010). Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 17(11), 1797-1809. <https://doi.org/10.1128/CVI.00268-10>
- Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238-250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Brouillette, E., Grondin, G., Shkreta, L., Lacasse, P., & Talbot, B. (2003). In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microbial Pathogenesis*, 35(4), 159-168.
- Budd, K., Mitchell, J., & Keane, O. (2016). Lineage associated expression of virulence traits in bovine-adapted *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, 189, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.013>



- Cosgrove, K., Coutts, G., Jonsson, I., Tarkowski, A., Kokai-Kun, J., Mond, J., & Foster, S. (2007). Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 1025-1035. <https://doi.org/10.1128/JB.01524-06>
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., & Penadés, J. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183(9), 2888-2896. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001>
- Cucarella, C., Tormo, M., Knecht, E., Amorena, B., Lasa, I., Foster, T., & Penadés, J. (2002). Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infection and Immunity*, 70(6), 3180-3186.
- Cucarella, C., Tormo, M., Ubeda, C., Trotonda, M., Monzón, M., Peris, C., Penadés, J. (2004). Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 72(4), 2177-2185.
- Donlan, R., & Costerton, J. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Eckersall, P., Young, F., Nolan, A., Knight, C., McComb, C., Waterston, M., Fitzpatrick, J. (2006). Acute Phase Proteins in Bovine Milk in an Experimental Model of *Staphylococcus aureus* Subclinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1488-1501. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72216-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72216-0)
- Farhat, K., Sauter, K., Brcic, M., Frey, J., Ulmer, A., & Jungi, T. (2008). The response of HEK293 cells transfected with bovine TLR2 to established pathogen-associated molecular patterns and to bacteria causing mastitis in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125(3-4), 326-336. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.05.026>
- Finlay, B., & Cossart, P. (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5313), 718-725.
- Foster, T., Geoghegan, J., Ganesh, V., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(1), 49-62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Fowler, T., Wann, E., Joh, D., Johansson, S., Foster, T., & Höök, M. (2000). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell $\beta 1$ integrins. *European Journal of Cell Biology*, 79(10), 672-679. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00104>



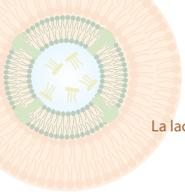


- Fowler, V., Fey, P., Reller, L., Chamis, A., Corey, G., & Rupp, M. (2001). The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Medical Microbiology and Immunology*, 189(3), 127-131. <https://doi.org/10.1007/s430-001-8018-5>
- Fu, Y., Zhou, E., Liu, Z., Li, F., Liang, D., Liu, B., Yang, Z. (2013). *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 155(4), 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.08.003>
- Gomes, F., Saavedra, M., & Henriques, M. (2016). Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and Disease*, 74(3). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw006>
- Goodyear, C., & Silverman, G. (2004). Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), 11392-11397. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404382101>
- Grönlund, U., Johannisson, A., & Persson Waller, K. (2006). Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 80(2), 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.05.002>
- Günther, J., Esch, K., Poschadel, N., Petzl, W., Zerbe, H., Mitterhuemer, S., Seyfert, H. (2011). Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity*, 79(2), 695-707. <https://doi.org/10.1128/IAI.01071-10>
- Günther, J., Koczan, D., Yang, W., Nürnberg, G., Reipsilber, D., Schuberth, H., Seyfert, H. (2009). Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Veterinary Research*, 40(4), 31. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009014>
- Günther, J., Petzl, W., Bauer, I., Ponsuksili, S., Zerbe, H., Schuberth, H., Seyfert, H. (2017). Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Scientific Reports*, 7(1), 4811. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05107-4>



- Gurao, A., Kashyap, S., & Singh, R. (2017). β -defensins: An innate defense for bovine mastitis. *Veterinary World*, *10*(8), 990-998. <https://doi.org/10.14202/vet-world.2017.990-998>
- Herry, V., Gitton, C., Tabouret, G., Répérant, M., Forge, L., Tasca, C., Rainard, P. (2017). Local immunization impacts the response of dairy cows to *Escherichia coli mastitis*. *Scientific Reports*, *7*(1), 3441. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03724-7>
- Heuck, A., Tweten, R., & Johnson, A. (2001). Beta-barrel pore-forming toxins: intriguing dimorphic proteins. *Biochemistry*, *40*(31), 9065-9073.
- Hill, A. W. (1981). Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. *Research in Veterinary Science*, *31*(1), 107-112.
- Hillerton, J., & Kliem, K. (2002). Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *Journal of Dairy Science*, *85*(4), 1009-1014. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74161-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74161-1)
- Huang, Y., Morimoto, K., Hosoda, K., Yoshimura, Y., & Isobe, N. (2012). Differential immunolocalization between lingual antimicrobial peptide and lactoferrin in mammary gland of dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *145*(1-2), 499-504. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.10.017>
- Im, J., Lee, T., Jeon, J., Baik, J., Kim, K., Kang, S., Han, S. (2014). Gene expression profiling of bovine mammary gland epithelial cells stimulated with lipoteichoic acid plus peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*. *International Immunopharmacology*, *21*(1), 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.05.002>
- Jardetzky, T., Brown, J., Gorga, J., Stern, L., Urban, R., Chi, Y., Wiley, D. (1994). Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*, *368*(6473), 711-718. <https://doi.org/10.1038/368711a0>
- Karavolos, M., Horsburgh, M., Ingham, E., & Foster, S. (2003). Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* (Reading, England), *149*(Pt 10), 2749-2758. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26353-0>
- Keefe, G. (2012). Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *28*(2), 203-216. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010>
- Kiku, Y., Nagasawa, Y., Tanabe, F., Sugawara, K., Watababe, A., Hata, E., Hayashi, T. (2016). The cell wall component lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* induces chemokine gene expression in bovine mammary epithelial cells. *The Journal of*



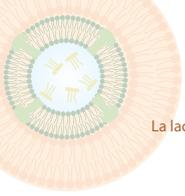


- Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0706>
- Kim, K., Im, J., Jeon, J., Lee, H., Yun, C., & Han, S. (2011). *Staphylococcus aureus* induces IL-1 β expression through the activation of MAP kinases and AP-1, CRE and NF- κ B transcription factors in the bovine mammary gland epithelial cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(4), 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.04.004>
- Kim, Y., Atalla, H., Mallard, B., Robert, C., & Karrow, N. (2011). Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Research*, 7, 51. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-51>
- Laarman, A., Ruyken, M., Malone, C., van Strijp, J., Horswill, A., & Rooijackers, S. (2011). *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 186(11), 6445-6453. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002948>
- Lara, L., López, J., & Ochoa, A. (2011). *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 51(5), 313-318. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.07.010>
- Latorre, D., Berlutti, F., Valenti, P., Gessani, S., & Puddu, P. (2012). LF immunomodulatory strategies: mastering bacterial endotoxin. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 90(3), 269-278. <https://doi.org/10.1139/o11-059>
- Lehmann, M., Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. (2013). Concomitant lipopolysaccharide-induced transfer of blood-derived components including immunoglobulins into milk. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 889-896. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5410>
- Li, N., Richoux, R., Boutinaud, M., Martin, P., & Gagnaire, V. (2014). Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy Science & Technology*, 94(6), 517-538. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0176-3>
- Liu, G., Essex, A., Buchanan, J., Datta, V., Hoffman, H., Bastian, J., Nizet, V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(2), 209-215. <https://doi.org/10.1084/jem.20050846>
- Marino, R., Considine, T., Sevi, A., McSweeney, P., & Kelly, A. (2005). Contribution of proteolytic activity associated with somatic cells in milk to cheese ripening. *International Dairy Journal*, 15(10), 1026-1033. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.10.006>



- McCarthy, H., Rudkin, J., Black, N., Gallagher, L., O'Neill, E., & O'Gara, J. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00001>
- McGuire, K., Jones, M., Werling, D., Williams, J., Glass, E., & Jann, O. (2006). Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Animal Genetics*, 37(1), 47-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01364.x>
- Meade, K., Cormican, P., Narciandi, F., Lloyd, A., & O'Farrelly, C. (2014). Bovine β -defensin gene family: opportunities to improve animal health? *Physiological Genomics*, 46(1), 17-28. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00085.2013>
- Mehrzad, J., Duchateau, L., & Burvenich, C. (2005). High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Veterinary Research*, 36(1), 101-116. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004055>
- Miles, G., Movileanu, L., & Bayley, H. (2002). Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 11(4), 894-902. <https://doi.org/10.1110/ps.4360102>
- National Mastitis Council. (2001). Guidelines on normal and abnormal raw milk based on SCC and signs of clinical mastitis.
- O'Gara, J. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(2), 179-188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D., & O'Gara, J. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5), 1379-1388. <https://doi.org/10.1128/JCM.02280-06>
- Park, B., & Lee, J. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*, 45, e66. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>
- Pastoret, P. (1998). Handbook invertebrate immunology. USA: Academic Press.
- Pereyra, E., Dallard, B., & Calvinho, L. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 363-375. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70096-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70096-3)



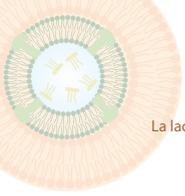


- Petzer, I., Karzis, J., Donkin, E., Webb, E., & Etter, E. (2017a). Somatic cell count thresholds in composite and quarter milk samples as indicator of bovine intramammary infection status. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, *84*(1), e1-e10.
- Petzer, I., Karzis, J., Donkin, E., Webb, E., & Etter, E. (2017b). Validity of somatic cell count as indicator of pathogen-specific intramammary infections. *Journal of the South African Veterinary Association*, *88*(0), e1-e10.
- Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Seyfert, H., Hussien, J., & Schuberth, H. (2017). Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. *Research in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.012>
- Philpot, N., & Nickerson, S. (2000). Ganando la lucha contra la mastitis (Vol. 1). Westfalia.
- Piepers, S., Prenafeta, A., Verbeke, J., De Visscher, A., March, R., & De Vlieghe, S. (2017). Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. *Journal of Dairy Science*, *100*(1), 769-782. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11269>
- Pöhlmann-Dietze, P., Ulrich, M., Kiser, K., Döring, G., Lee, J., Fournier, J., Wolz, C. (2000). Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. *Infection and Immunity*, *68*(9), 4865-4871.
- Postma, B., Poppelier, M., van Galen, J., Prossnitz, E., van Strijp, J., de Haas, C., & van Kessel, K. (2004). Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *172*(11), 6994-7001.
- Pozzi, C., Waters, E., Rudkin, J., Schaeffer, C., Lohan, A., Tong, P., O'Gara, J. (2012). Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathogens*, *8*(4), e1002626. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002626>
- Puddu, P., Latorre, D., Valenti, P., & Gessani, S. (2010). Immunoregulatory role of lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, *23*(3), 387-397. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9307-3>
- Rainard, P., Fromageau, A., Cunha, P., & Gilbert, F. (2008). *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. *Veterinary Research*, *39*(5), 52. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008034>



- Rohde, H., Frankenberger, S., Zähringer, U., & Mack, D. (2010). Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European Journal of Cell Biology*, 89(1), 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.10.005>
- Rooijackers, S., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M., Presanis, J., Sim, R., van Strijp, J. (2005). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nature Immunology*, 6(9), 920-927. <https://doi.org/10.1038/ni1235>
- Schukken, Y., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M., Goetze, L., Holst, O., Seyfert, H. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3-4), 270-289. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.022>
- Schwarz-Linek, U., Werner, J., Pickford, A., Gurusiddappa, S., Kim, J., Pilka, E., Potts, J. (2003). Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature*, 423(6936), 177-181. <https://doi.org/10.1038/nature01589>
- Shafer-Weaver, K., Pighetti, G., & Sordillo, L. (1996). Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 212(3), 271-280.
- Shimazaki, K., & Kawai, K. (2017). Advances in lactoferrin research concerning bovine mastitis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 95(1), 69-75. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0044>
- Smith, M., Mitchell, A., Li, G., Ding, S., Fitzmaurice, A., Ryan, K., Goldberg, J. (2003). Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR5, but Not TLR4, Are Required for Helicobacter pylori-induced NF- κ B Activation and Chemokine Expression by Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 32552-32560. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305536200>
- Sordillo, L. (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*, 98(1), 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.017>
- Swain, D., Kushwah, M., Kaur, M., Patbandha, T., Mohanty, A., & Dang, A. (2014). Formation of NET, phagocytic activity, surface architecture, apoptosis and expression of toll like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) in neutrophils of mastitic cows. *Veterinary Research Communications*, 38(3), 209-219. <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9606-1>





- Thammavongsa, V., Kern, J., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2009). *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(11), 2417-2427. <https://doi.org/10.1084/jem.20090097>
- Thammavongsa, V., Kim, H., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2015). Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(9), 529-543. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3521>
- Thammavongsa, V., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2013). *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6160), 863-866. <https://doi.org/10.1126/science.1242255>
- Tormo, M., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I., & Penadés, J. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 7), 2465-2475. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27865-0>
- Valle, J., Latasa, C., Gil, C., Toledo-Arana, A., Solano, C., Penadés, J., & Lasa, I. (2012a). Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002843. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002843>
- Viguié, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & O'Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27(8), 486-493. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.004>
- Wang, H., Yu, G., Yu, H., Gu, M., Zhang, J., Meng, X., Li, J. (2015). Characterization of TLR2, NOD2, and related cytokines in mammary glands infected by *Staphylococcus aureus* in a rat model. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57, 25. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0116-0>
- Weber, A., Weber, A. T., McDonald, T. L., & Larson, M. (2006). *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid induces differential expression of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells: Implications for early diagnosis of mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1-2), 79-83. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.023>
- Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 192(2), 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.013>



- Whelehan, C., Meade, K., Eckersall, P., Young, F., & O'Farrelly, C. (2011). Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140(3-4), 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.11.013>
- Yang, W., Zerbe, H., Petzl, W., Brunner, R., Günther, J., Draing, C., Seyfert, H. (2008). Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Molecular Immunology*, 45(5), 1385-1397. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.09.004>
- Yokoyama, R., Itoh, S., Kamoshida, G., Takii, T., Fujii, S., Tsuji, T., & Onozaki, K. (2012). Staphylococcal superantigen-like protein 3 binds to the Toll-like receptor 2 extracellular domain and inhibits cytokine production induced by *Staphylococcus aureus*, cell wall component, or lipopeptides in murine macrophages. *Infection and Immunity*, 80(8), 2816-2825. <https://doi.org/10.1128/IAI.00399-12>
- Zhao, X., & Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science*, 86(13 Suppl), 57-65. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0302>



¿Cómo se desarrolla la glándula?, ¿cómo empieza la producción de calostro y la secreción de leche?, ¿cómo entra en latencia la glándula y posteriormente reinicia el ciclo lactogénico?, ¿cómo se relaciona la glándula con el medio externo y en particular con los microorganismos potencialmente patógenos? A través del curso de posgrado “Fisiología de la Lactancia” y ahora con este libro, el grupo de investigación Biogénesis de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia ha estado contribuyendo a responder a estas y otras preguntas relacionadas con el funcionamiento celular y molecular de la glándula mamaria, que es parte del sistema reproductivo y elemento fundamental de la industria láctea.

Este libro pretende llenar una necesidad sentida de la comunidad académica nacional, así como contribuir a la educación continua de médicos veterinarios y zootecnistas, particularmente en aspectos patológicos y productivos.