



ARTÍCULO ESPECIAL

## Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos

Elizabet A.L. Pereyra<sup>a,b</sup>, Bibiana E. Dallard<sup>a,b</sup> y Luis F. Calvinho<sup>c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina

<sup>b</sup> Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral), UNL-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina

<sup>c</sup> Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Santa Fe, Argentina

<sup>d</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL, Santa Fe, Argentina

Recibido el 17 de abril de 2014; aceptado el 29 de octubre de 2014

### PALABRAS CLAVE

Mastitis bovina;  
*Staphylococcus aureus*;  
Respuesta inmune  
innata

### KEYWORDS

Bovine mastitis;  
*Staphylococcus aureus*;  
Innate immune  
response

### Resumen

*Staphylococcus aureus* es el principal agente causante de mastitis bovina en Argentina y en el mundo. Esta bacteria ocasiona infecciones crónicas que generan importantes pérdidas a los productores y la industria lechera. El objetivo de este artículo es caracterizar los mecanismos que intervienen en la infección causada por *S. aureus* en la glándula mamaria bovina, evaluando dos aspectos diferentes del proceso infeccioso: por un lado, lo vinculado con la respuesta inmune innata por parte del hospedador, y por otro, la capacidad de la bacteria para evadir el sistema inmune e interactuar con diferentes tipos celulares. La exploración de la interacción de *S. aureus* con el sistema inmune de la glándula mamaria bovina permitirá identificar blancos para delinear nuevas alternativas preventivas o curativas, que contribuyan a evitar o eliminar las infecciones causadas por este organismo.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Aspects of the innate immune response to intramammary *Staphylococcus aureus* infections in cattle

### Abstract

*Staphylococcus aureus* is the pathogen most frequently isolated from bovine mastitis worldwide, causing chronic intramammary infections that limit profitable dairying. The objective of this article is to characterize the mechanisms involved in *S. aureus* mammary gland infections considering two different aspects of the infectious process; on the one

\* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: calvinho.luis@inta.gob.ar (L.F. Calvinho).

hand, the aspects involved in the host innate immune response and on the other hand, the capacity of this organism to evade the immune system and interact with different cell types. The exploration of *S. aureus* interactions with the immune response of bovine mammary gland will help identify targets to outline new preventive or curative alternatives for intramammary infections caused by this organism.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Introducción

La mastitis bovina es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente a la industria láctea. Ocasiona grandes pérdidas económicas debido al deterioro de la calidad de la leche, al aumento de costos directos e indirectos por tratamientos antibióticos de casos clínicos y al descarte temprano de animales<sup>71</sup>. Dentro de los patógenos contagiosos causantes de mastitis, *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico más prevalente tanto en Argentina<sup>20</sup> como en otros países de gran desarrollo lechero<sup>93</sup>. La infección por *S. aureus* comienza con un episodio subclínico o clínico agudo, generalmente evoluciona hacia la cronicidad y puede persistir a lo largo de toda la vida del animal<sup>73</sup>. La eficacia de curación en casos crónicos luego del tratamiento con antibióticos es baja y no existe una terapia efectiva para eliminar por completo la infección del cuarto mamario afectado<sup>13</sup>. Entre otros factores, se considera que el éxito limitado de la terapia con antibióticos está dado por la habilidad de *S. aureus* de evadir la respuesta inmune del hospedador y sobrevivir dentro de diferentes tipos de células de la glándula mamaria (GM) por un largo período sin causar una inflamación clínica<sup>4,32,36</sup>.

Numerosos artículos de revisión han demostrado que la patogenicidad de *S. aureus* es un proceso complejo y multifactorial, resultado de la acción combinada de más de 50 factores de virulencia que son expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección en distintos órganos y hospedadores<sup>28,29,83,84,94</sup> (colonización, evasión de las defensas del hospedador, multiplicación y diseminación bacteriana). En las infecciones intramamarias (IIM), la patogénesis y la propagación de *S. aureus* dependen de la expresión de los factores de virulencia de la bacteria<sup>24,55,61,89</sup>, del medio ambiente<sup>70</sup> y del hospedador, lo que en conjunto determina la frecuencia y gravedad de las infecciones. En relación con el establecimiento y la persistencia de la infección por *S. aureus* en la GM bovina, se ha postulado que esta se asocia con una respuesta inmune deficiente mediada por factores de origen bacteriano y del hospedador<sup>12,13</sup>, y se ha destacado el rol fundamental de la respuesta inmune innata frente a este patógeno<sup>65,67,68</sup>.

El sistema de defensa de la GM contra los patógenos causantes de mastitis está mediado por factores inmunológicos innatos y adquiridos asociados a este tejido, que actúan en forma coordinada. La eficiencia de estos mecanismos resulta determinante de la resistencia a nuevas infecciones<sup>65,76,77</sup>. En la presente actualización se caracterizan los mecanismos que intervienen en la infección causada por *S. aureus* en la GM bovina evaluando aspectos que involucran la respuesta inmune innata del hospedador y la capacidad de la bacteria para evadirla y persistir en diferentes tipos celular

res. Un mayor entendimiento de la interacción de *S. aureus* con el sistema inmune de la GM bovina permitirá identificar blancos para delinear nuevas alternativas preventivas o curativas tendientes a evitar o eliminar las infecciones y a minimizar las pérdidas por esta enfermedad.

## Mecanismos de la respuesta inmune en la glándula mamaria

Los mecanismos de la respuesta inmune en la GM bovina involucran diversos factores físicos, celulares y moleculares, que se engloban dentro de la inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa durante las etapas tempranas de la interacción con el organismo. Es el factor clave determinante del establecimiento, la progresión y la gravedad de la infección, así como del desarrollo de la respuesta inmune adaptativa<sup>1</sup>. Dependiendo de la eficiencia de estos mecanismos, los patógenos pueden ser eliminados en cuestión de minutos u horas después de la invasión. Si esto ocurre, no se producirán cambios notables en la función de la GM o en la calidad de la leche<sup>88</sup>.

Los componentes del sistema de defensa innato de la GM incluyen barreras físicas, como el esfínter del pezón; barreras químicas, como la queratina del canal del pezón; factores solubles como la lactoferrina (Lf); lisozima; proteínas del complemento; citoquinas y quimioquinas. Además, existen elementos celulares que incluyen macrófagos, células dendríticas (CD), mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y células asesinas naturales<sup>65</sup> (NK). La inmunidad específica o adaptativa se orquesta en poblaciones celulares que reconocen antígenos particulares de los patógenos y está mediada por linfocitos B, a través de la síntesis de anticuerpos, y por linfocitos T, en forma directa o a través de la síntesis de factores solubles. Esta respuesta tiene la particularidad de ser más efectiva luego de cada exposición al patógeno y su activación secundaria mediada por linfocitos T y B permitiría su eliminación<sup>77</sup>.

## Reconocimiento del patógeno e iniciación de la respuesta inmune innata

El contacto de las bacterias que ingresan a la GM con las células del sistema inmune presentes en la leche y con las células epiteliales que recubren los conductos excretores desencadena la inducción de la respuesta inmune innata, la cual constituye la primera línea de defensa contra los patógenos causantes de mastitis<sup>88</sup>. Una respuesta inmune rápida y efectiva se basa en el reconocimiento precoz de los patógenos potenciales<sup>3,27,63</sup>. La respuesta inmune innata se inicia

cuando receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors* [PRR]) específicos, presentes en la superficie o dentro de las células del hospedador, se unen a moléculas particulares de las bacterias, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns* [PAMP]). Estos patrones moleculares constituyen un conjunto de moléculas conservadas y comparadas por grupos diversos de microorganismos y están presentes en su superficie o se liberan cuando los microorganismos se replican o degradan<sup>81</sup>. Los PRR se expresan en los leucocitos de la leche y en las células epiteliales de la GM<sup>80</sup>.

Los receptores tipo *toll* (*toll like receptors* [TLR]) forman parte de los PRR, son proteínas estructuralmente relacionadas que reconocen diferentes PAMP e inducen la producción de factores secretados, como citoquinas<sup>3</sup>. Los receptores TLR2 y TLR4 están particularmente involucrados en infecciones bacterianas, se activan sobre todo en respuesta a las infecciones con bacterias gram positivas y gram negativas, respectivamente<sup>81</sup>. La unión del ligando al TLR estimula la activación del factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B* [NF- $\kappa$ B]) y de quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases* [MAPK]), lo que conduce a la producción de importantes mediadores de la inmunidad innata tales como interleuquina (IL) -6, IL-12, IL-18, interferón (IFN)- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Concomitantemente, la señalización por TLR induce la expresión de moléculas coestimuladoras esenciales para la iniciación de la respuesta inmune adaptativa, como B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), que son proteínas de superficie expresadas por células presentadoras de antígeno (APC). La presencia de estas moléculas coestimuladoras y la presentación de los componentes antigénicos microbianos activan las células T CD4<sup>+</sup> requeridas para iniciar la respuesta inmune adaptativa<sup>81</sup>.

Todas las vías de transducción de señales de TLR activan finalmente el NF- $\kappa$ B<sup>2</sup>. La vía dependiente de MyD88 (proteína de diferenciación mielóide primaria) se asocia con la fase de respuesta temprana de NF- $\kappa$ B, mientras que la vía independiente de MyD88 se asocia con la fase de respuesta tardía de NF- $\kappa$ B<sup>34</sup>. Se ha determinado que la expresión de citoquinas durante la mastitis bovina se correlaciona con la activación de NF- $\kappa$ B<sup>44,91</sup> y que la magnitud y duración de la respuesta de citoquinas depende del patógeno actuante<sup>9</sup>. En general, las bacterias gram negativas que expresan lipopolisacáridos (LPS) en su superficie, como los organismos coliformes, inducen una respuesta de citoquinas proinflamatorias rápida y de mayor magnitud que las bacterias gram positivas, como *S. aureus*<sup>88</sup>.

### Factores determinantes de la respuesta diferenciada de citoquinas frente a distintos patógenos

En infecciones mamarias experimentales por *Escherichia coli* se ha observado un incremento en las concentraciones de IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL-12, factor de necrosis tumoral alfa [*tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ )] e IL-8 en leche en las primeras 48 horas postinoculación; mientras que las últimas dos citoquinas no fueron detectadas tras la infección experimental por *S. aureus*. Esto sugiere que esta respuesta limitada favorecería el establecimiento de la infección por este

organismo<sup>8</sup>. Sin embargo, los mecanismos determinantes de esa respuesta no han sido totalmente esclarecidos. En las IIM causadas por *S. aureus*, el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-6 son las citoquinas proinflamatorias predominantes. Se han detectado transcritos de ARNm de estas citoquinas en leche proveniente de vacas con IIM crónicas<sup>68,69</sup> y con IIM agudas experimentales por *S. aureus*<sup>45</sup>, aunque la transcripción fue marcadamente menor a la observada frente a infecciones experimentales por *E. coli*<sup>45</sup>. Se observó un incremento en la transcripción de TNF- $\alpha$  en células de leche en mastitis clínica causada por *S. aureus* a las 24 horas postinoculación, con una fuerte disminución 8 horas más tarde<sup>5</sup>. Esta disminución coincidió con un incremento en la producción de IL-1 $\beta$ , la que se mantuvo elevada por 8 horas.

La expresión de citoquinas en cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas (*primary bovine mammary epithelial cells* [pbMEC]) cocultivadas con *E. coli* inactivadas con calor se agrupa en una red regulatoria con una posición central de TNF- $\alpha$  e IL-1, mientras que en un entorno idéntico para *S. aureus*, estas citoquinas fueron reguladas negativamente. Ambas bacterias mostraron una regulación positiva de la IL-6, posiblemente debida a un mecanismo independiente de la vía de MyD88, ya que la anulación completa de esta vía de señalización del TLR en pbMEC no modificó la expresión de esta citoquina<sup>34</sup>. Por otra parte, en células cocultivadas con *S. aureus* inactivados con calor se observó una regulación positiva del IFN- $\beta$ , también atribuida a una activación del NF- $\kappa$ B independiente de MyD88<sup>34</sup>. El bloqueo o la falta de activación de la señalización del TLR mediante la vía dependiente de MyD88 por *S. aureus* en células epiteliales mamarias (CEM) bovinas podría ser la causa por la cual genes efectoros claves en la respuesta inmune innata no se activan tempranamente luego de la IIM; este tipo de células predominan en la GM sana. Tales genes codifican la síntesis de enzimas bactericidas, como  $\beta$ -defensinas<sup>90</sup> y óxido nítrico sintetasa inducible (*inducible nitric oxid synthase* [iNOS]), entre otros. Particularmente, la falta de activación de estos genes en las CEM podría explicar, en parte, la falla en la eliminación del patógeno observada en mastitis subclínicas persistentes causadas por bacterias gram positivas<sup>60</sup>.

Estudios recientes han demostrado que el cocultivo de CEM bovinas con *S. aureus* aislado de mastitis clínica afecta la activación NF- $\kappa$ B y da como resultado una expresión muy baja de ARNm de TNF- $\alpha$ <sup>44</sup>. Yang et al.<sup>91</sup> examinaron la activación de los receptores de patógenos TLR2 y TLR4 por ligandos derivados de *S. aureus*. Estos investigadores observaron que el cocultivo de pbMEC con *E. coli* y *S. aureus* inactivados por calor inducían la expresión de genes codificantes de IL-8 y TNF- $\alpha$ ; sin embargo, la inducción por parte de *S. aureus* fue un 5 % menor que la observada con *E. coli*. Esta respuesta disminuida en la expresión de citoquinas estuvo acompañada de una pérdida completa de la activación de NF- $\kappa$ B por *S. aureus* o ácido lipoteicoico (LTA) en pbMEC. Los citados autores concluyeron que la causa de la inadecuada respuesta inmune inducida por *S. aureus* no se debió a una alteración en la unión del TLR a su ligando, sino a una regulación negativa de la activación de NF- $\kappa$ B en pbMEC por el patógeno, lo que debilitó la respuesta inmune en la GM.

La falta de señalización del NF- $\kappa$ B por PAMP de *S. aureus* podría relacionarse con el incremento en la producción de

factor transformante del crecimiento beta [*transforming growth factor* (TGF- $\beta$ )] en la GM infectada con *S. aureus*, lo cual causaría el bloqueo de la vía de señalización dependiente de MyD88, tal como lo propone Naiki *et al.*<sup>57</sup>. Por otra parte, Gilbert *et al.*<sup>31</sup> postulan que, a diferencia de *E. coli*, en pbMEC *S. aureus* utilizaría la vía de activación de la proteína de activación 1 (AP-1) en vez de NF- $\kappa$ B, induciendo una respuesta inmune más restrictiva que la de *E. coli*, con la consecuente disminución en la activación de genes involucrados en el reclutamiento de células y defensas inmunes locales. En la tabla 1 se resumen los mecanismos inducidos

por *S. aureus* que determinan una respuesta diferenciada de citoquinas en la GM bovina.

### Evasión del reconocimiento de TLR y respuesta celular

La evasión del reconocimiento de TLR ha recibido un creciente interés en los últimos años, aunque los estudios disponibles son escasos. Recientemente, se ha propuesto un nuevo mecanismo de escape de las defensas inmunes del hospedador por parte de *S. aureus* que involucra la interferencia con

Tabla 1 Mecanismos inducidos por *Staphylococcus aureus* que conducen a una respuesta diferenciada de citoquinas en la glándula mamaria bovina, según estudios realizados *in vivo* e *in vitro*

Citoquinas	Respuesta a <i>S. aureus</i> /LTA	Mecanismo potencial	Modelo experimental
TNF- $\alpha$	Ausencia en leche durante las primeras 48 h postinfección <sup>8</sup>	Bloqueo o fracaso en la activación de señalización de TLR mediante la vía dependiente de MyD88, con la consecuente disminución en la síntesis de enzimas bactericidas y compuestos antibacterianos	Infecciones intramamarias experimentales con <i>S. aureus</i>
	Expresión génica aumentada en leche a las 24 h postinfección, con fuerte disminución 8 h más tarde <sup>5,45</sup> Niveles no detectables en sobrenadante de cultivo de pbMEC <sup>31,18</sup> Expresión génica disminuida en pbMEC <sup>34,43,44,91</sup>	Regulación negativa de la activación de NF- $\kappa$ B por el patógeno	Estudios <i>in vitro</i>
IL-1 $\beta$	Resultados discordantes en cuanto a su detección en leche: incrementos de los niveles a las 32 h postinfección, y se mantiene elevada por 8 h <sup>8</sup> , o ausencia <sup>68,69</sup>	Bloqueo o fracaso en la activación de señalización de TLR mediante la vía dependiente de MyD88, con la consecuente disminución en la síntesis de enzimas bactericidas y compuestos antibacterianos	Infecciones intramamarias experimentales con <i>S. aureus</i>
	Expresión génica aumentada en leche a las 32 h postinfección, se mantiene Niveles no detectables en sobrenadante de cultivo de pbMEC <sup>31,18</sup> Expresión génica disminuida en pbMEC <sup>34,43,44</sup>	Regulación negativa de la activación de NF- $\kappa$ B por el patógeno	Estudios <i>in vitro</i>
IL-8	Ausencia en leche durante las primeras 48 h postinfección <sup>8</sup>	Bloqueo o fracaso en la activación de señalización de TLR mediante la vía dependiente de MyD88, con la consecuente disminución en la síntesis de enzimas bactericidas y compuestos antibacterianos	Infecciones intramamarias experimentales con <i>S. aureus</i>
	Expresión génica disminuida en pbMEC <sup>43,44,91</sup>	Regulación negativa de la activación de NF- $\kappa$ B por el patógeno	Estudios <i>in vitro</i>
IL-6, IFN- $\beta$	Expresión génica aumentada en pbMEC <sup>34</sup> .	Activación de NF- $\kappa$ B por un mecanismo independiente de la vía de MyD88	Estudios <i>in vitro</i>
TGF- $\beta$	Expresión génica aumentada en pbMEC <sup>31,58</sup>	Bloqueo de la vía de señalización dependiente de MyD88. Posible utilización de la vía AP-1	Estudios <i>in vitro</i>
	Expresión proteica aumentada en IIM crónicas por <i>S. aureus</i> <sup>6</sup>	Intensa remodelación del tejido mamario infectado	Estudios <i>ex vivo</i>

la vía de reconocimiento de las células inmunes<sup>92</sup>. Al respecto, se ha demostrado que la proteína SSL3, un superantígeno de *S. aureus*, bloquea la activación de TLR2 a través de la interacción extracelular directa con el receptor<sup>11</sup>. Particularmente, SSL3 se uniría al dominio extracelular del TLR2 e inhibiría la producción de TNF- $\alpha$  por parte de macrófagos murinos en respuesta a la estimulación con *S. aureus* inactivado por calor, peptidoglicanos (PGN) o lipopéptidos. Este nuevo mecanismo de evasión descrito incrementa el conocimiento actual sobre la interacción bacteria-hospedador y abre nuevos caminos para el estudio de la patogenia de la mastitis bovina causada por este patógeno. En relación con el conocimiento actual sobre este tipo de exoproteínas de *S. aureus* aislados de IIM en bovinos, Smyth *et al.*<sup>78</sup> examinaron la ocurrencia de 7 genes que codifican miembros de la familia de exoproteínas SSL, y observaron que todas las cepas analizadas contenían el locus *ssl*, con pequeñas variaciones en el número de genes *ssl* presentes.

Para examinar el posible rol de TLR2 en la respuesta celular, Watanabe *et al.*<sup>87</sup> determinaron los niveles de fagocitosis y la consiguiente muerte de las bacterias fagocitadas por macrófagos obtenidos de ratones deficientes en TLR2 y en ratones *wild type*. Estos autores observaron que la fagocitosis de *S. aureus* y *E. coli* fue similar entre macrófagos provenientes de ambas cepas de ratones. Sin embargo, la supervivencia de *S. aureus* fagocitados, pero no de *E. coli*, disminuyó en mayor medida en los macrófagos deficientes en TLR2 en comparación con los *wild type*. Por otra parte, luego de la incubación de macrófagos de ratones *wild type* con *S. aureus* observaron incrementos en los niveles de las formas fosforiladas de tres MAPK (JNK, ERK1/ERK2 y p38). En cambio, en macrófagos provenientes de ratones deficientes en TLR2, los niveles de JNK fosforilados permanecieron bajos luego de la incubación con *S. aureus*, mientras que la activación de ERK1/ERK2 y p38 ocurrió normalmente. Estos resultados sugieren que de las tres MAPK, solo JNK se fosforila y activa en macrófagos estimulados con *S. aureus* en una manera dependiente de TLR2. Además, ambas cepas de ratones demostraron un nivel reducido de superóxido en los macrófagos que habían fagocitado a *S. aureus*. Estos investigadores proponen que tras reconocer a *S. aureus*, el receptor TLR2 activaría la quinasa JNK para suprimir la producción de superóxido, lo que conduciría a la prolongación de la vida de las bacterias en los fagosomas<sup>87</sup>. Sin embargo, se necesitan nuevos estudios que clarifiquen el mecanismo de regulación negativa en la producción de superóxido mediado por JNK en las bacterias fagocitadas.

Si los resultados obtenidos de los estudios mencionados se aplican a las IIM por *S. aureus* en bovinos, se podría inferir que la disminución de la habilidad de reconocer al patógeno, actuando sola o en combinación con una respuesta inmune reducida a la colonización bacteriana, podría contribuir a la habilidad de *S. aureus* para evadir la respuesta inmune innata del hospedador y favorecer su establecimiento en la GM.

### Células que participan en la respuesta inmune innata

Las células somáticas de la leche en GM sanas están compuestas principalmente por macrófagos, pero también in-

cluyen linfocitos, neutrófilos y CEM<sup>75</sup>. La predisposición de la GM a la infección con diferentes patógenos podría estar influenciada por el número de células somáticas de la leche antes del contacto con el patógeno: bajos recuentos de células somáticas (RCS) podrían asociarse con mayor riesgo y gravedad de la mastitis. La tasa con la cual se incrementa o disminuye el número de células somáticas de la leche durante las IIM también difiere de acuerdo con el patógeno: *E. coli* induce altos RCS en forma rápida ( $> 500 \times 10^3$  células/ml) dentro de las 24 horas, que pueden caer a los niveles pre-infección a las 48 horas, mientras que *S. aureus* genera un incremento más gradual a lo largo de un período de 48 a 72 horas<sup>8</sup>.

### Células epiteliales mamarias

En la GM sana, las CEM superan en número a cualquier otro tipo celular, por lo que la probabilidad de tomar contacto con los patógenos invasores es mayor. En un estudio reciente en cabras, Brenaut *et al.*<sup>16</sup> investigaron la respuesta transcripcional *in vivo* de las CEM luego de la IIM experimental con *S. aureus* utilizando métodos no invasivos para obtener ARN. Las CEM reaccionaron durante las primeras 24-30 horas post-infección expresando una amplia batería de genes que codifican diferentes citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y proteínas de fase aguda, lo cual destaca su rol en el inicio y el desarrollo del proceso inflamatorio<sup>16</sup>.

Como se mencionó, la inducción de las funciones inmunes en las CEM depende del patógeno con el cual estas interactúan. *Escherichia coli* activa la expresión de un amplio repertorio de genes, de modo que dentro de las 24 horas se incrementan en unas 1000 veces las concentraciones de ARNm de citoquinas claves (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8), y aproximadamente 100 veces las concentraciones de ARNm de varios genes efectores de las defensas inmunes, como los que codifican  $\beta$ -defensinas, óxido nítrico sintetasa inducible (NO-S2A) y amiloide sérico A3<sup>33,90</sup> (SAA3). En cambio, luego del contacto con *S. aureus*, la inducción de estos genes se ve disminuida<sup>44</sup>. Esto se debería, en parte, al impedimento de la cascada de señalización intracelular dependiente de MyD88, inmediatamente aguas abajo de los receptores transmembrana TLR2 y TLR4, ya que *S. aureus* imposibilitaría la formación de una plataforma estructural alrededor del dominio intracelular del TLR (TIR), necesaria para la unión de otros factores de la cascada de señalización intracelular<sup>48</sup>. Como consecuencia, *S. aureus* induce una reacción inmune en las CEM exclusivamente dominada por la IL-6, mientras que *E. coli* también activa citoquinas adicionales (IL-1 y TNF- $\alpha$ ). La retroalimentación positiva que inducen IL-1 y TNF- $\alpha$  en la producción de citoquinas por las CEM está disminuida en la respuesta inmune desencadenada por *S. aureus*, lo cual podría favorecer el establecimiento de la bacteria en la GM<sup>34</sup>.

Gilbert *et al.*<sup>31</sup> demostraron que la estimulación de pM-EC, tanto con LPS de *E. coli* como con sobrenadante de cultivo de *S. aureus* proveniente de mastitis bovina, no logró aumentar los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en sobrenadante de cultivo. En concordancia con estos hallazgos, se reportó que ciertos PAMP de *Staphylococcus*, como muramil dipéptido (MDP) y LTA, no lograron aumentar la producción de citoquinas proinflamatorias en sobrenadante de cultivo de

pbMEC<sup>18</sup>. Sin embargo, se observó que MDP y LTA actuaron sinérgicamente para inducir la producción de varios factores quimiotácticos de neutrófilos secretados por las CEM, la cual fue dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B<sup>18</sup>. En conjunto, estos estudios sugieren que las CEM podrían afectar diferencialmente la respuesta inflamatoria global en función de cómo reconocen y responden a los diferentes PAMP bacterianos. Por lo tanto, la gravedad y duración de la mastitis podría estar relacionada no solamente con la expresión de TLR, sino también con las vías de señalización inducidas por TLR que se activan en las CEM.

### Macrófagos

Los macrófagos constituyen el tipo celular predominante en leche de la GM bovina sana durante la lactancia; estos participan en la respuesta inmune innata y adquirida. Durante las IIM, los macrófagos están implicados en múltiples niveles y son indispensables para el reconocimiento y la eliminación de las bacterias causantes de mastitis. Más allá de la actividad como fagocitos profesionales, la habilidad de los macrófagos para secretar sustancias que faciliten la migración y actividad de otros tipos celulares sería la de mayor importancia en la respuesta innata de la GM<sup>76</sup>.

Durante el parto se produce una alteración muy profunda de las capacidades funcionales de los macrófagos, que ha sido directamente relacionada con la incidencia de enfermedad. Aunque el número de macrófagos bovinos es alto en la última semana de gestación, la capacidad fagocítica de estas células decrece, posiblemente debido a la baja actividad opsónica en secreción mamaria y a una disminución de la IgM. Adicionalmente, la expresión de MHC-II por los macrófagos bovinos durante el parto disminuye, lo cual podría contribuir a una pobre presentación de antígenos y dar como resultado una débil respuesta inmune específica de los linfocitos de la GM<sup>51</sup>.

Recientemente se demostró que la infección *in vitro* de macrófagos bovinos con *S. aureus* indujo su activación, tanto a través de la vía clásica como de la alternativa<sup>47</sup>. La activación alternativa del macrófago podría ser un mecanismo que contribuye a la persistencia intracelular de *S. aureus* en el curso de la inflamación mamaria en bovinos, ya que se ha propuesto que induciría la producción de IL-10 (citoquina antiinflamatoria) e inhibiría, en consecuencia, la vía clásica de activación del macrófago.

En un estudio realizado en tejido mamario proveniente de vacas en período de involución activa se observó un incremento del número de monocitos/macrófagos inmunomarcados con anti-CD14 en las GM de animales crónicamente infectados con *S. aureus*, en comparación con lo observado en glándulas no infectadas<sup>25</sup>. Esto indica que estas células podrían jugar un rol importante en las IIM causadas por este microorganismo, asociado a un intento de reparar el daño tisular durante la infección crónica.

### Neutrófilos

Los neutrófilos juegan un papel clave en las defensas de la GM, y su rápida movilización desde la sangre hacia la leche es crucial para prevenir la proliferación de bacterias de crecimiento rápido y la subsecuente mastitis aguda<sup>59</sup>.

El cambio a una población predominantemente neutrofílica en la GM ocurre luego del reconocimiento bacteriano y liberación de quimioatrayentes por parte de los macrófagos y CEM. Los neutrófilos eliminan al patógeno principalmente por fagocitosis y muerte intracelular empleando numerosos mecanismos antibacterianos: formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), estallido respiratorio, péptidos antibacterianos y defensinas. Los neutrófilos activados liberan el material nuclear y el contenido de sus gránulos de manera similar a una red, que físicamente atrapa bacterias. Estas trampas contienen al patógeno y lo ubican en un entorno local con altas concentraciones de agentes antimicrobianos liberados por los neutrófilos, de esta manera aumentan las posibilidades de muerte bacteriana<sup>17</sup>. Las funciones fagocíticas y el estallido oxidativo de los neutrófilos se reducen drásticamente cuando toman contacto con la leche, debido a la ingestión de grasa y caseína<sup>54</sup>. Sin embargo, las funciones alternativas de los neutrófilos como la liberación de NET, no parecen verse afectadas por la presencia de leche<sup>49</sup>. Por lo tanto, los NET podrían constituir importantes mecanismos bactericidas durante las IIM<sup>49</sup>. En un estudio reciente sobre proteómica de leche proveniente de bovinos infectados con *S. aureus*, se detectó una alta concentración de proteínas intervinientes en la formación de NET, y se ha postulado que estos podrían tener relevancia funcional en las IIM por este patógeno<sup>66</sup>. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar si los NET en asociación con la grasa de la leche conservan su actividad antimicrobiana.

El reclutamiento de neutrófilos a la GM bovina varía en intensidad y rapidez de acuerdo con el agente infeccioso<sup>65</sup>. En mastitis bovinas experimentales subclínicas por *S. aureus* se demostró un reclutamiento moderado ( $> 10^6$  células/ml) y tardío (entre 24 y 48 horas postinfección) de neutrófilos a las GM inoculadas, en coincidencia con el aislamiento del microorganismo de leche durante ese lapso<sup>68</sup>. En un estudio posterior, Riollot *et al.*<sup>69</sup> determinaron que durante la infección crónica de la GM bovina por *S. aureus*, los neutrófilos constituyen el tipo celular predominante en leche, y representan el 55 % al 96 % del total de células. Si bien el número de neutrófilos durante la infección crónica se incrementa notablemente, su actividad se encuentra disminuida, lo cual se manifiesta por la menor expresión de moléculas de adhesión en su superficie<sup>69</sup>. Este tipo de respuesta podría favorecer el establecimiento de una IIM crónica durante la cual la inflamación y la migración leucocitaria continúan durante meses, con el consecuente daño al parénquima mamario.

Estudios *in vitro* en neutrófilos aislados de leche bovina demostraron que la producción de leucotoxinas (Luk) por parte de *S. aureus* puede contribuir a la evasión inmune en la GM<sup>14</sup>. Las Luk forman poros en los leucocitos, se inhibe así la fagocitosis y se favorece la persistencia de la bacteria en la GM. Se ha demostrado que la totalidad de los aislamientos de *S. aureus* de mastitis bovina poseen genes vinculados con la producción de  $\gamma$ -hemolisina (*hlg*), la gran mayoría para LukE/D y del 10 % al 50 % para LukM/LukF'-PV<sup>30</sup>. En neutrófilos aislados de leche bovina, LukM/LukF'-PV han demostrado ser las leucotoxinas más citotóxicas<sup>14</sup>. En la tabla 2 se resumen las funciones principales de las células que participan en la respuesta inmune innata en la GM

**Tabla 2** Funciones principales de las células que participan en la respuesta inmune innata en la glándula mamaria (GM) y mecanismos potencialmente utilizados por *Staphylococcus aureus* para evadir la respuesta inmune celular

Células	Funciones inmunes principales en la GM	Potenciales mecanismos de evasión
Células epiteliales mamarias (CEM)	Rol clave en el reconocimiento del patógeno y en el inicio y desarrollo del proceso inflamatorio	El contacto de <i>S. aureus</i> con la CEM imposibilitaría la formación de una plataforma estructural alrededor del dominio TIR del TLR, que alteraría la cascada de señalización intracelular <sup>48</sup>
Macrófagos	Capacidad de sintetizar y secretar citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y proteínas de fase aguda	<i>S. aureus</i> induce en las CEM una reacción inmune dominada por la IL-6 <sup>34</sup>
	Fagocitosis y muerte intracelular de la bacteria	Activación de la quinasa JNK y supresión de la producción de superóxido por parte de los macrófagos que han fagocitado a <i>S. aureus</i> , lo que prolonga la vida de las bacterias en los fagosomas <sup>87</sup>
	Secreción de citoquinas y quimioquinas	Persistencia intracelular de la bacteria por activación alternativa del macrófago. Mecanismo posible: la inducción de la producción de IL-10 inhibiría la vía clásica de activación del macrófago <sup>47</sup>
Neutrófilos	Presentación antigénica en asociación con MHC-II	
	Fagocitosis y muerte intracelular de la bacteria	En infecciones crónicas por <i>S. aureus</i> : incremento significativo en el número de neutrófilos, pero disminución de su actividad, y menor expresión de moléculas de adhesión en su superficie <sup>69</sup>
	Secreción de factores antibacterianos	Las leucotoxinas de <i>S. aureus</i> forman poros en los leucocitos que inhiben la fagocitosis y favorecen la persistencia de la bacteria en la GM <sup>14,30</sup>

bovina y los mecanismos potenciales que utiliza *S. aureus* para evadir la respuesta inmune celular.

## Defensas solubles endógenas

El microambiente de la GM sana contiene Lf, lisozima, factores del complemento, citoquinas, quimioquinas, inmunoglobulinas y otras moléculas solubles bactericidas y bacteriostáticas. Estos factores poseen una eficacia variable contra los diferentes patógenos causantes de mastitis de acuerdo con las diferentes etapas de la lactancia<sup>1</sup>.

### Lactoferrina

La Lf es uno de los antimicrobianos más caracterizados de la GM bovina. Producida por las CEM y los leucocitos, la Lf es una proteína de unión al Fe con conocidas capacidades bacteriostáticas. En presencia de bicarbonato, la Lf puede secuestrar iones férricos libres presentes en leche y, por lo tanto, impedir el crecimiento de bacterias que tienen requerimientos de Fe, como estafilococos y bacterias coliformes<sup>1</sup>. Chaneton *et al.*<sup>21</sup> analizaron la capacidad conjunta de

la Lf y la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) para inhibir el crecimiento de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina y observaron que la coincubación de ambas proteínas a concentraciones fisiológicas con las bacterias redundó en una actividad antibacteriana aumentada, lo que sugiere un efecto inhibitorio aditivo de estas proteínas.

Numerosas especies causantes de mastitis han demostrado ser susceptibles a la Lf. Sin embargo, existe información divergente con respecto a la potencia y el espectro de acción de la Lf, y además, se han encontrado diferencias en la susceptibilidad a Lf entre aislamientos de una misma especie<sup>46</sup>. También se han hallado diferencias en cuanto al tipo de inhibición ejercida, ya que presenta actividad bactericida sobre algunas cepas de *S. aureus* mientras que parece ser bacteriostática sobre otras<sup>64</sup>.

### Lisozima

Entre los componentes de las defensas innatas, la lisozima ha mostrado un comportamiento particular en las IIM por *S. aureus*. De hecho, la actividad de la enzima se vio disminuida en leche proveniente de GM infectadas con *S. aureus*<sup>62</sup>. Esta disminución podría ser el resultado de un agotamiento

precoz de la actividad enzimática asociado a una reducción en la actividad oxidativa de los neutrófilos<sup>58</sup>. Además, la actividad de la enzima podría estar influenciada por la cepa de *S. aureus* causante de la IIM<sup>72</sup>. Estudios recientes *in vitro* sugieren que la liberación de lisozima por parte de las CEM se comporta de manera dosis-dependiente y que se necesitan al menos 100 000 UFC/ml de *S. aureus* en la leche para desencadenar su producción<sup>94</sup>.

### Proteínas del complemento

El sistema del complemento es un conjunto de proteínas presentes en suero y leche, sintetizadas principalmente por los hepatocitos, monocitos y macrófagos tisulares. La activación del sistema del complemento genera varios fragmentos proinflamatorios, de los cuales el fragmento C5 está especialmente asociado con la mastitis<sup>1</sup>.

Se ha demostrado que determinados componentes del complemento están asociados con la severidad de la mastitis. En un estudio reciente, se comprobó que C5a, en ausencia de otros factores estimulatorios, fue capaz de inducir la señalización de TLR4 en neutrófilos bovinos, y que eso ocasionó un aumento en la expresión génica de IL-8<sup>79</sup>. La capacidad de componentes del complemento para iniciar la señalización de TLR4 podría contribuir a la gravedad de la mastitis y, posiblemente, a la resolución del proceso inflamatorio agudo. En infecciones experimentales por *E. coli*, el reclutamiento de neutrófilos a la GM coincide temporalmente con el aumento en la concentración de C5a e IL-8 en leche, las que actúan como potentes quimiotácticos. En cambio, en IIM experimentales por *S. aureus*, el componente C5a no fue detectado en leche durante las primeras 24 horas postinfección, pero sí mostró un aumento transitorio a las 32 horas postinfección. Asimismo, la infección experimental no indujo cambios en las concentraciones de IL-8 en leche<sup>8</sup>. Coincidentemente con esta respuesta inmune disminuida frente al patógeno, en infecciones experimentales por *S. aureus* se ha observado un reclutamiento tardío y bajo de neutrófilos a la GM, lo que podría favorecer el establecimiento de la infección<sup>68</sup>.

Los aislamientos de *S. aureus* de seres humanos expresan factores de virulencia adicionales, como el inhibidor estafilocócico del complemento [*Staphylococcal complement inhibitor* (SCIN)], que bloquea la formación de C3b y protege a la bacteria de la fagocitosis por neutrófilos y proteínas inhibidoras de la quimiotaxis [*chemotaxis inhibitor proteins of Staphylococcus aureus* (CHIPS)]; estas últimas se unen al receptor de C5a, bloqueando la afinidad de unión del agonista. El bloqueo del receptor en la superficie de los neutrófilos interfiere con la quimiotaxis y extravasación desde la sangre al sitio de infección<sup>85</sup>. Kumagai *et al.*<sup>42</sup> detectaron los genes *scn* y *chp*, que codifican las proteínas SCIN y CHIPS en cepas de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina. Se necesitan nuevos estudios en esta área para revelar el significado de estas proteínas en la patogenia de la mastitis causada por *S. aureus* y su contribución en la evasión de la respuesta inmune.

### Citoquinas y quimioquinas

El papel de las citoquinas y quimioquinas en la GM se ha estudiado intensamente en los últimos años. Si bien juegan

un rol fundamental en la respuesta del hospedador a la infección, también pueden generar efectos deletéreos sobre aquel. Por lo tanto, existe un fino balance entre los efectos positivos y negativos de las citoquinas en el hospedador, que está establecido por la maduración, cantidad y ubicación de su expresión. La capacidad fisiológica e inmunomoduladora de las citoquinas es compleja, la mayoría tiene vidas medias muy cortas y pueden actuar en forma individual o interactuar con otras<sup>1</sup>.

**Citoquinas proinflamatorias:** Las dos citoquinas más importantes que claramente promueven la inflamación son la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ . Estas IL son mediadores claves de la respuesta inmune sistémica y local; no solo regulan la expresión de una amplia batería de genes incluyendo otras citoquinas, enzimas y proteínas de fase aguda, sino también de genes relacionados con la proliferación y la apoptosis. La IL-6 es la tercera citoquina proinflamatoria clave que media la respuesta de fase aguda en la inflamación, aunque también puede tener propiedades antiinflamatorias<sup>9</sup>.

Comparada con otras citoquinas, la respuesta de IL-1 $\beta$  frente a IIM experimentales ha mostrado ser altamente variable<sup>8,68</sup>. En el caso de IIM por bacterias gram positivas, la inducción de IL-1 $\beta$  estuvo retrasada en comparación con la observada en la infección por bacterias gram negativas<sup>38</sup>. Si bien la producción de ARNm de IL-1 $\beta$  ha mostrado estar regulada positivamente en células de leche aisladas de GM infectadas con *S. aureus*<sup>69</sup>, se han observado resultados discordantes en cuanto a la detección de la proteína en leche. Riollet *et al.*<sup>68</sup> no detectaron esta citoquina en leche luego del desafío experimental con *S. aureus*; en cambio, Banneman *et al.*<sup>8</sup> observaron un aumento en las concentraciones de IL-1 $\beta$  en leche luego de las 32 horas posdesafío con este organismo y estas se mantuvieron por 8 horas adicionales.

El TNF- $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria producida por macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales<sup>7</sup>. A nivel local, el TNF- $\alpha$  promueve la activación endotelial, el reclutamiento y la posterior activación de leucocitos en el sitio de la infección, mientras que los efectos sistémicos incluyen la inducción de fiebre y de proteínas de fase aguda<sup>19</sup>. Como se ha mencionado anteriormente en la sección sobre reconocimiento del patógeno e iniciación de la respuesta inmune, durante la mastitis bovina causada por bacterias gram negativas se han detectado concentraciones elevadas de esta citoquina en sangre y leche<sup>8,68</sup>, mientras que las bacterias gram positivas o sin pared celular promueven una respuesta de TNF- $\alpha$  mínima o demorada<sup>38</sup>. A pesar de que aún se desconocen las causas de la falta de desarrollo de una respuesta temprana de TNF- $\alpha$  en las IIM en bovinos, Kauf *et al.*<sup>38</sup> demostraron que el organismo no parecería regular negativamente a esta citoquina, ya que la infusión de LPS en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* indujo una producción de TNF- $\alpha$  en concentraciones comparables con las de las infecciones por bacterias gram negativas. Respecto de las IIM crónicas por *S. aureus*, se ha observado por técnicas de inmunohistoquímica un incremento de los porcentajes de inmunomarcación de TNF- $\alpha$  y del número de monocitos/macrófagos CD14+ durante la involución mamaria activa, lo que indica que esta citoquina, en asociación con los monocitos/macrófagos, tiene una participación destacada en la respuesta inmune de las IIM persistentes



durante el período de no lactación<sup>25</sup>. Son necesarios nuevos estudios para determinar la relación de esta citoquina con células del tejido mamario y otras citoquinas en IIM crónicas durante el período de involución.

La IL-6 es una citoquina con propiedades pro- y antiinflamatorias, y está implicada en aspectos que involucran tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, a través de su capacidad para inducir aumento de la temperatura, diferenciación de linfocitos B y la correspondiente producción de inmunoglobulinas, la activación de linfocitos T y el incremento de la respuesta proinflamatoria de los neutrófilos<sup>39</sup>. Se ha observado una mayor expresión de ARNm de IL-6 en células somáticas aisladas de leche proveniente de bovinos con mastitis adquiridas en forma natural<sup>69,82</sup> o inducidas experimentalmente<sup>46</sup> en comparación con células aisladas de leche de GM no infectadas. La abundancia relativa de estos transcritos ha sido detectada tanto en vacas infectadas con *E. coli* como con *S. aureus*. Asimismo, se han observado incrementos en las concentraciones de la IL-6 en leche y sangre de vacas con mastitis adquiridas naturalmente<sup>35</sup> e inducidas experimentalmente<sup>26</sup>.

Como se ha mencionado en secciones anteriores, estudios *in vitro* sugieren que la señalización inducida por la IL-6 domina la respuesta de las pbMEC a *S. aureus* inactivado por calor<sup>34</sup>; y que la rápida y elevada expresión de esta citoquina luego de la estimulación con la bacteria está acompañada de incrementos en las concentraciones de ARNm de IFN- $\beta$ 1 e IFN- $\beta$ 2. Se ha demostrado que el IFN- $\beta$  inhibe la liberación de citoquinas proinflamatorias, como la IL-12, a través de un incremento de la síntesis de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica en seres humanos<sup>86</sup>, y que este regularía en forma negativa al IFN- $\gamma$ , con lo que se reduciría tanto la expresión de MHC-II sobre las APC<sup>37</sup> como la expresión de moléculas de adhesión y metalopeptidasas de la matriz [*matrix metallopeptidasas* (MMPs)]<sup>50</sup>. El desafío de las pbMEC con *S. aureus* no indujo la expresión de MHC o MMPs, ni de moléculas de adhesión intercelular [*intercellular adhesion molecules* (ICAMs)], lo cual sustenta la teoría propuesta<sup>34</sup>.

**Citoquinas antiinflamatorias:** Las IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$  suprimen la producción de citoquinas inflamatorias. Una de las IL antiinflamatorias más estudiada en la respuesta inmune en la GM es la IL-10. Esta IL tiene dos funciones principales: limitar la inflamación mediante la inhibición de la síntesis de citoquinas e influenciar sobre la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa al afectar la capacidad de monocitos y macrófagos para presentar antígenos a los linfocitos T por regulación negativa de la expresión de moléculas del MHC-II<sup>56</sup>.

Se ha demostrado que la infección experimental con *S. aureus* no induce una respuesta significativa de IL-10 en la GM bovina<sup>8</sup>. Si bien se ha documentado la expresión de ARNm de IL-10 en células de leche proveniente de cuartos mamaros con infecciones crónicas por *S. aureus*<sup>69</sup>, la estimulación de pbMEC con *S. aureus* no logró aumentar los niveles de ARNm de dicha citoquina<sup>43</sup>, lo que sugiere que las CEM no serían la fuente de IL-10 en la leche durante la infección por *S. aureus*.

La IL-4 es una citoquina crítica que favorece el desarrollo de la respuesta celular Th2<sup>74</sup>. Los transcritos de esta cito-

quina no fueron detectados en leche de cuartos mamaros crónicamente infectados con *S. aureus*<sup>74</sup>. Por otra parte, la IL-13 no ha sido explorada en la GM bovina en infecciones por *S. aureus*.

El TGF- $\beta$ , además de tener propiedades antiinflamatorias, regula un amplio espectro de actividades biológicas entre las que se incluyen el crecimiento y la diferenciación celular, la apoptosis, la migración celular, la angiogénesis y la producción de matriz extracelular<sup>52</sup>. Los genes de las tres isoformas de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3) se expresan en la GM bovina<sup>53</sup>; sin embargo, solo el TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 2 se han detectado en leche, con esta última como isoforma predominante<sup>22</sup>. Bannerman *et al.*<sup>10</sup> demostraron que la IIM por *S. aureus* durante la mitad de la lactancia inducía un incremento en la producción de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en leche. Por otra parte, mediante infecciones experimentales de GM bovina durante la lactancia media y tardía utilizando diferentes cepas de *S. aureus* conocidas, como SCV, se ha demostrado que las concentraciones séricas de TGF- $\beta$ 1 pueden variar en relación con la cepa infectante<sup>40</sup>.

El TGF- $\beta$  es un importante factor de diferenciación de células Th17, las cuales estimulan la respuesta inflamatoria durante infecciones que no son suficientemente controladas por la inmunidad Th1 o Th2<sup>41</sup>. Las células reguladoras, que incluyen Treg y macrófagos M2, también producen TGF- $\beta$  en humanos. Estas células colaboran en la prevención de los efectos adversos de la respuesta inmune prolongada o excesiva<sup>15</sup>. Estudios recientes han demostrado una mayor inmunoespresión de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 TGF- $\beta$ 3 y de los receptores TGF- $\beta$ R1 y TGF- $\beta$ R3 en cuartos mamaros con infecciones crónicas por *S. aureus* comparados con cuartos mamaros no infectados, lo que sugiere una respuesta dirigida a limitar el alcance de la inflamación y lesión tisular generada por el proceso infeccioso crónico<sup>6</sup>.

**Interferones:** Los IFN constituyen una familia de citoquinas con funciones inmunes moduladoras. Los IFN de tipo I, como el IFN- $\alpha$  y el IFN- $\beta$ , se expresan en todos los tipos de células, mientras que el IFN- $\gamma$  es producido exclusivamente por los leucocitos y es el más estudiado en la inmunidad de la GM bovina. Recientemente Gilbert *et al.*<sup>31</sup> demostraron una respuesta diferencial mayor en la activación de la vía del IFN tipo I luego de la estimulación de pbMEC con LPS de *E. coli*, y no observaron tal respuesta luego de la estimulación con sobrenadante de cultivo de *S. aureus*. En contraposición a estos resultados, otros estudios han demostrado la capacidad de *S. aureus* de activar genes dependientes de IFN<sup>34</sup>. Günther *et al.*<sup>34</sup> postulan que la activación de genes dependientes de IFN también puede resultar de la estimulación autocrina/paracrina de las CEM por la IL-6, gatillando la vía de STAT3. Se detectó la sobreexpresión de genes dependientes de IFN luego de las 24 horas de exposición de pbMEC a *S. aureus* inactivado por calor, por lo cual la estimulación de genes dependientes de IFN podría ser un evento tardío en la interacción *S. aureus*/CEM, al contrario de lo que ocurre en la interacción *E. coli*/CEM<sup>31</sup>.

El IFN- $\gamma$  promueve la diferenciación de células Th1 y suprime de forma concomitante la actividad de células Th2. Durante el curso de IIM experimentales por *S. aureus* se detectaron incrementos de las concentraciones de IFN- $\gamma$  en leche y de la expresión cuantitativa de ARNm en células

epiteliales, aunque en forma más tardía comparada con la infección por *E. coli*<sup>8,9,38,45,69</sup>. Es interesante destacar que las mayores concentraciones de IFN- $\gamma$  se han detectado en IIM caracterizadas por una persistencia de la infección, y que estas elevadas concentraciones coincidieron con un mayor número de bacterias recuperadas de las GM infectadas en comparación con las GM no infectadas<sup>38</sup>. Esta característica puede reflejar un intento del huésped de intensificar las respuestas inmunes mediadas por células para erradicar a los patógenos que no son efectivamente eliminados por los mecanismos de defensa innatos en etapas más tempranas de la infección.

Estudios recientes han destacado la importancia del IFN tipo III (IFN- $\lambda$ ) en la regulación de citoquinas inflamatorias durante infecciones pulmonares causadas por *S. aureus* en humanos, sin embargo se desconoce la importancia de este tipo de IFN en IIM en bovinos<sup>23</sup>.

**Quimioquinas:** Constituyen una gran familia de citoquinas que estimulan la migración de leucocitos desde la sangre al sitio de la inflamación. La IL-8 o quimioquina CXCL8 ha sido la más estudiada en la GM bovina durante la respuesta inmune. Numerosos trabajos demuestran un aumento en la expresión cuantitativa de ARNm de CXCL8 en el tejido mamario y de la proteína CXCL8 en leche después de la infección con diferentes patógenos causantes de mastitis<sup>9</sup>.

Se ha señalado ya el rol de la IL-8 en las IIM por *S. aureus* en asociación con otros componentes de la inmunidad innata en diferentes secciones de la presente revisión. A modo de resumen, cabe aclarar que estudios realizados con diferentes cepas de *S. aureus* no han logrado detectar incrementos de IL-8 en leche luego de la IIM experimental<sup>8,68</sup>. Por otra parte, numerosos trabajos independientes con diferentes cepas de *S. aureus* han mostrado expresión disminuida o ausencia completa de ARNm de IL-8 en tejido mamario y en células de leche en respuesta a la infección experimental<sup>45,91</sup>.

## Conclusión y perspectivas futuras

El conocimiento de los mecanismos de la respuesta inmune en la GM ha avanzado en forma significativa en los últimos años. Sin embargo, la mastitis bovina continúa siendo una enfermedad de alta prevalencia en los rodeos y con limitada respuesta a los tratamientos con antibióticos. Una respuesta óptima del hospedador contra los patógenos causantes de mastitis ocurre cuando los mecanismos inmunes están finamente regulados para lograr la eliminación del patógeno y el retorno del sistema inmune a la homeostasis. Aunque se ha avanzado mucho en la comprensión de la patogenia de la mastitis causada por *S. aureus* y los mecanismos que el microorganismo desarrolla para evadir la respuesta inmune del hospedador, aún existen áreas que no han sido exploradas. La mayoría de los estudios sobre persistencia de *S. aureus* en la GM han sido desarrollados *in vitro* en líneas celulares o en cultivos primarios de CEM, por lo que se necesitan nuevos estudios *in vivo* que permitan evaluar la respuesta inmune del hospedador frente a organismos con genotipos bacterianos definidos y caracterizados como de alta y baja adaptación a la GM, teniendo en cuenta

los factores de virulencia más relevantes de las cepas estudiadas y la integridad de la respuesta inmune del hospedador. Los resultados que en el futuro se obtengan contribuirán a develar las complejas interacciones que determinan el establecimiento, la progresión y la cronicidad de las IIM causadas por *S. aureus* y, eventualmente, aportarán información para delinear alternativas superadoras que complementen los programas de prevención y control actuales.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por las siguientes fuentes: Proyecto PICT 2010 N° 872 (ANPCyP), PNSA 1115054 (INTA).

## Bibliografía

- Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011;16:291-304.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*. 1996;79:1021-6.
- Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL, Cullor JS. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2003;50:105-11.
- Andreotti CS, Pereyra EA, Baravalle C, Renna MS, Ortega HH, Calvino LF, Dallard BE. *Staphylococcus aureus* chronic intramammary infection modifies protein expression of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) subfamily components during active involution. *Res Vet Sci*. 2014;96:5-14.
- Angelini DJ, Hasday JD, Goldblum SE, Bannerman DD. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated pulmonary endothelial barrier dysfunction. *Curr Respir Med Rev*. 2005;1:233-46.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11:463-72.

9. Bannerman DD. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J Anim Sci.* 2009;87(13 Suppl):10-25.
10. Bannerman DD, Paape MJ, Chockalingam A. *Staphylococcus aureus* intramammary infection elicits increased production of transforming growth factor- $\alpha$ ,  $\beta$ 1, and  $\beta$ 2. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;112:309-15.
11. Bardoel BW, Striijp JA. Molecular battle between host and bacterium: recognition in innate immunity. *J Mol Recognit.* 2011;24:1077-86.
12. Bardiau M, Detilleux J, Farnir F, Mainil JG, Ote I. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2014;169:74-9.
13. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 2006;89:1877-95.
14. Barrio MB, Rainard P, Prévost G. LukM/LukF<sup>PV</sup> is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes Infect.* 2006;8:2068-74.
15. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 2008;181:3733-9.
16. Brenaut P, Lefèvre L, Rau A, Laloë D, Pisoni G, Moroni P, Bevilacqua C, Martin P. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Vet Res.* 2014;45:16.
17. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303:1532-5.
18. Bougarn S, Cunha P, Harmache A, Fromageau A, Gilbert FB, Rainard P. Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17:1797-809.
19. Brouckaert P, Fiers W. Tumor necrosis factor and the systemic inflammatory response syndrome. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;216:167-87.
20. Calvino LF, Tirante L. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Rev FAVE.* 2005;4:29-40.
21. Chaneton L, Pérez Sáez JM, Bussmann LE. Antimicrobial activity of bovine  $\beta$ -lactoglobulin against mastitis-causing bacteria. *J Dairy Sci.* 2011;94:138-45.
22. Chockalingam A, Paape MJ, Bannerman DD. Increased milk levels of transforming growth factor- $\alpha$ ,  $\beta$ 1, and  $\beta$ 2 during *Escherichia coli*-induced mastitis. *J Dairy Sci.* 2005;88:1986-93.
23. Cohen TS, Prince AS. Bacterial pathogens activate a common inflammatory pathway through IFN $\lambda$  regulation of PDCD4. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003682.
24. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JS. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2004;72:2177-85.
25. Dallard BE, Baravalle C, Ortega HH, Tumini M, Canavesio VR, Neder VE, Calvino LF. Effect of a biological response modifier on expression of CD14 receptor and tumor necrosis factor- $\alpha$  in *Staphylococcus aureus*-infected mammary glands at drying off. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;132:237-42.
26. Dernfalk J, Persson Waller K, Johannisson A. The xMAP technique can be used for detection of the inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in bovine samples. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;118:40-9.
27. Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 1997;276:718-25.
28. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12:49-62.
29. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:948-58.
30. Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muñoz J, Alvarez MA, Martín MC. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1278-84.
31. Gilbert FB, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Robert-Granié C, Rupp R, Rainard P. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res.* 2013;44:40.
32. Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol.* 2000;164:3713-22.
33. Günther J, Koczan D, Yang W, Nürnberg G, Reipsilber D, Schuberth HJ, Park Z, Maqbool N, Molenaar A, Seyfert HM. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet Res.* 2009;40:31-9.
34. Günther J, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum H, Seyfert HM. 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  $\alpha$ . *Infect Immun.* 2011;79:695-707.
35. Hagiwara K, Yamanaka H, Hisaeda K, Taharaguchi S, Kirisawa R, Iwai H. Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. *Vet Res Commun.* 2001;25:99-108.
36. Hébert A, Sayasith K, Sénéchal S, Dubreuil P, Lagacé J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;193:57-62.
37. Huynh HK, Oger J, Dorovini-Zis K. Interferon- $\beta$  downregulates interferon- $\gamma$ -induced class II MHC molecule expression and morphological changes in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 1995;60:63-73.
38. Kauf AC, Vinyard BT, Bannerman DD. Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *Res Vet Sci.* 2007;82:39-46.
39. Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci.* 1996;1:d340-d357.
40. Kim Y, Atalla H, Mallard B, Robert C, Karrow N. Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res.* 2011;7:51-63.
41. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
42. Kumagai R, Nakatani K, Ikeya N, Kito Y, Kaidoh T, Takeuchi S. Quadruple or quintuple conversion of hlb, sak, sea (or sep), scn, and chp genes by bacteriophages in non-beta-hemolysin-producing bovine isolates of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol.* 2007;122:190-5.
43. Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollet C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine.* 2007;38:12-21.
44. Lara-Zárate L, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by

- prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* 2011;51:313-8.
45. Lee JW, Bannerman DD, Paape MJ, Huang MK, Zhao X. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet Res.* 2006;37:219-29.
  46. Lee NY, Kawai K, Nakamura I, Tanaka T, Kumura H, Shimazaki K. Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk. *J Vet Med Sci.* 2004;66:1267-9.
  47. Lewandowska-Sabat AM, Boman GM, Downing A, Talbot R, Storset AK, Olsaker I. The early phase transcriptome of bovine monocyte-derived macrophages infected with *Staphylococcus aureus* *in vitro*. *BMC Genomics.* 2013;14:891.
  48. Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature.* 2010;465:885-90.
  49. Lippolis JD, Reinhardt TA, Goff JP, Horst RL. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;113:248-55.
  50. Liuzzi GM, Latronico T, Fasano A, Carlone G, Riccio P. Interferon-beta inhibits the expression of metalloproteinases in rat glial cell cultures: implications for multiple sclerosis pathogenesis and treatment. *Mult Scler.* 2004;10:290-7.
  51. Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL, Van Kampen CL, Wagter L, Wilkie BN. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J Dairy Sci.* 1998;81:585-95.
  52. Massagué J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 2006;580:2811-20.
  53. Maier R, Schmid P, Cox D, Bilbe G, McMaster GK. Localization of transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 gene expression in bovine mammary gland. *Mol Cell Endocrinol.* 1991;82:191-8.
  54. Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Vet Res.* 2005;36:101-16.
  55. Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J.* 2006;171:398-407.
  56. Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:61-76.
  57. Naiki Y, Michelsen KS, Zhang W, Chen S, Doherty TM, Arditi M. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Biol Chem.* 2005;280:5491-5.
  58. Niwa Y, Sakane T, Yokoyama M, Skosey JL, Miyachi Y. Reverse relationship between lysosomal-enzyme release and active-oxygen generation in stimulated human neutrophils. *Mol Immunol.* 1985;22:973-80.
  59. Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res.* 2003;34:597-627.
  60. Petzl W, Zerbe H, Günther J, Yang W, Seyfert HM, Nürnberg G, Schuberth HJ. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res.* 2008;39:18.
  61. Piccinini R, Borromeo V, Zecconi A. Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Vet Microbiol.* 2010;145:100-5.
  62. Piccinini R, Bronzo V, Moroni P, Luzzago C, Zecconi A. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Res.* 1999;66:501-10.
  63. Pöhlmann-Dietze P, Ulrich M, Kiser KB, Döring G, Lee JC, Fournier JM, Botzenhart K, Wolz C. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. *Infect Immun.* 2000;68:4865-71.
  64. Rainard P. Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Vet Microbiol.* 1986;11:387-92.
  65. Rainard P, Riollet C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.* 2006;37:369-400.
  66. Reinhardt TA, Sacco RE, Nonnecke BJ, Lippolis JD. Bovine milk proteome: quantitative changes in normal milk exosomes, milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Proteomics.* 2013;82:141-54.
  67. Rinaldi M, Li RW, Bannerman DD, Daniels KM, Evock-Clover C, Silva MV, Paape MJ, Van Ryssen B, Burvenich C, Capuco AV. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Funct Integr Genomics.* 2010;10:21-38.
  68. Riollet C, Rainard P, Poutrel B. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv Exp Med Biol.* 2000;480:247-58.
  69. Riollet C, Rainard P, Poutrel B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci.* 2001;84:1077-84.
  70. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *J Dairy Sci.* 1998;81:687-93.
  71. Saran A, Chaffer M. Mastitis y calidad de leche. Buenos Aires, Argentina, Inter-Médica; 2000.
  72. Scarpa M, Piccinini R, Brun P, Grillo A, Palù G, Mengoli C, Daprà V, Castagliuolo I, Zecconi A. Relationship between virulence factor genes in bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis isolates and binding to anti-adhesin antibodies. *J Dairy Res.* 2010;77:159-67.
  73. Sears PM, McCarthy KK. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2003;19:171-85.
  74. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med.* 1992;176:1091-8.
  75. Sordillo LM. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest Prod Sci* 2005;98:89-99.
  76. Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002;7:135-46.
  77. Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM; members of the Pfizer mastitis research consortium. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;144:270-89.
  78. Smyth DS, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ. Occurrence of *ssl* genes in isolates of *Staphylococcus aureus* from animal infection. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 3):418-25.
  79. Stevens MG, Van Poucke M, Peelman LJ, Rainard P, De Spiegeleer B, Rogiers C, Van de Walle GR, Duchateau L, Burvenich C. Anaphylatoxin C5a-induced toll-like receptor 4 signaling in bovine neutrophils. *J Dairy Sci.* 2011;94:152-64.
  80. Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine.* 2005;31:72-86.

81. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17:1-14.
82. Taylor BC, Keefe RG, Dellinger JD, Nakamura Y, Cullor JS, Stott JL. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell Immunol*. 1997;182:68-76.
83. Tuschscherr LP, Buzzola FR, Alvarez LP, Caccuri RL, Lee JC, Sordelli DO. Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. *Infect Immun*. 2005;73:7932-7.
84. Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, Engebretsen IL, Bayles KW, Horswill AR, Kielian T. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. *J Immunol*. 2011;186:6585-96.
85. van Wamel WJ, Rooijackers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol*. 2006;188:1310-5.
86. Wang X, Chen M, Wandinger KP, Williams G, Dhib-Jalbut S. IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2000;165:548-57.
87. Watanabe I, Ichiki M, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. TLR2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages: a novel bacterial strategy against host innate immunity. *J Immunol*. 2007;178:4917-25.
88. Wellnitz O, Bruckmaier RM. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J*. 2012;192:148-52.
89. Wu X, Wang Y, Tao L. Sulfhydryl compounds reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;316:44-50.
90. Yang W, Molenaar A, Kurts-Ebert B, Seyfert HM. NF-kappaB factors are essential, but not the switch, for pathogen-related induction of the bovine beta-defensin 5-encoding gene in mammary epithelial cells. *Mol Immunol*. 2006;43:210-25.
91. Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Gunther J, Draing C, von Aulock S, Schuberth HJ, Seyfert HM. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF- $\alpha$  and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol*. 2008;45:1385-97.
92. Yokoyama R, Itoh S, Kamoshida G, Takii T, Fujii S, Tsuji T, Onozaki K. 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. *Infect Immun*. 2012;80:2816-25.
93. Zecconi A, Calvino LF, Fox KL. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *IDF Bulletin*. 2006;408:1-36.
94. Zecconi A, Scali F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol Lett*. 2013;150:12-22.