

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE ORÉGANO *Origanum vulgare* EMULSIONADO SOBRE MASTITIS BOVINA

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE OREGANO EXTRACT *Origanum vulgare* EMULSIONED ON BOVINE MASTITIS

Johnny Bravo Loor, Carlos Suárez Porto, Albert Espinoza Vélez, Jesús Muñoz Cedeño

Carrera Medicina Veterinaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico Sitio El Limón, ubicado en el km 2.7 vía Calceta- El Morro- El Limón, sector El Gramal

Contacto: jonisitobravol@hotmail.com

Información del artículo

Tipo de artículo:
Artículo original

Recibido:
12/08/2019

Aceptado:
23/12/2019

Licencia:
CC BY-NC-SA 4.0

Revista
ESPAMCIENCIA
10(2):71-77

Resumen

Se obtuvo extracto acuoso de hojas de orégano *Origanum vulgare* para determinar su actividad antibacteriana en vacas en producción con mastitis bovina destilándolo por arrastre de vapor, con 12 y 14% de concentración en compuestos fenólicos y se emulsionó (O/W) usando dos métodos: ultrasonido y agitación magnética. Para el diagnóstico se usó el test de California (CMT) y se confirmó mediante conteo de células somáticas (CCS) por citometría fija y unidades formadoras de colonias (UFC)/mL en cultivos de agaros Manitol y MacConkey para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente. La aplicación de 5 mL del extracto emulsionado vía intramamaria posterior al ordeño y amamantamiento de la cría durante 3 días con cánulas de acero inoxidable. El ensayo se condujo en un diseño completamente al azar y análisis de varianza con arreglo bifactorial; los resultados indican diferencias estadísticas no significativas para el CCS y UFC/mL entre las concentraciones (12 y 14%) de compuestos fenólicos, no obstante, sí hubo diferencias significativas $p < 0,05$ para el método de elaboración ultrasonido en las UFC/mL para colonias de *S. aureus* y el CCS, por lo que se concluye que el producto tiene efecto inhibitor sobre esta bacteria.

Palabras clave: Inflamación mamaria, células somáticas, emulsión, *S. aureus*, agitación magnética

Abstract

Aqueous extract of oregano leaves *Origanum vulgare* was obtained to determine its antibacterial activity in cows in production with bovine mastitis distilled by steam entrainment, with 12 and 14% concentration in phenolic compounds and it was emulsified (O/W) using two methods: ultrasound and magnetic stirring. For the diagnosis, the California test (CMT) was used and confirmed by somatic cell count (SCC) by fixed cytometry and colony-forming units (CFU) / mL in Mannitol and MacConkey agar crops for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* respectively. The application of 5 mL of the emulsified extract via intramammary after milking and breastfeeding for 3 days with stainless steel cannulas. The trial was conducted in a completely randomized design and analysis of variance with bifactorial arrangement; The results indicate non-significant statistical differences for the CCS and CFU / mL between the concentrations (12 and 14%) of phenolic compounds. However, there actually were significant differences $p < 0.05$ for the method of ultrasound processing in the CFU / mL for colonies of *S. aureus* and the CCS, so it is concluded that the product has an inhibitory effect on this bacterium.

Keywords: Breast inflammation, somatic cells, emulsion, *S. aureus*, magnetic stirring

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las pérdidas económicas por mastitis bovina se han estimado en \$ 35 mil millones anuales (Wellenberg *et al.*, 2002) y es considerada la enfermedad

infecciosa del ganado lechero de mayor impacto económico, debido a una disminución en la producción de leche y deterioro de la calidad (Ceron-Muñoz *et al.*, 2002). Esta enfermedad puede presentarse en forma clínica, subclínica o crónica (Wellenberg *et al.*, 2002), así

mismo Cotrino (2003) estima que el 10% de los casos de mastitis corresponden a la forma clínica y casi el 90% a la subclínica; esto coincide con lo expresado por la OEA (2003), al señalar que las grandes pérdidas en producción láctea son ocasionada fundamentalmente en la forma subclínica. La prevalencia mundial de la infección de los microorganismos patógenos de la mastitis es aproximadamente del 50% en vacas lecheras, y el nivel de infección de los cuartos del 25% (Radostis, 2001).

En Ecuador en el año 2015 se estimaba una población de alrededor de 4,12 millones de cabezas de ganado; de las cuales en Manabí existen 893 mil que representan el 21,7%, seguido por Esmeraldas con 331 mil bovinos. Manabí es la provincia que lidera a nivel nacional el número de cabezas de ganado vacuno; sin embargo, no se destaca en la producción y venta de leche, registrándose 610 mil litros de leche a nivel nacional. Las provincias más representativas se centran en la Sierra, se exhibe a Pichincha con 17,93%, seguida por Cotopaxi con el 10,63%, al ostentar Manabí el 12,24% se sitúa en un segundo lugar respecto a la producción de leche (ESPAC, 2014). Es de considerar que esta provincia ha mantenido índices de mastitis producto de la infestación de los cuartos mamarios de las vacas en producción. En Manabí, se determina que la prevalencia de mastitis subclínica en ganaderías de Portoviejo, el valle Carrizal-Chone y zonas áridas es de 21,5% (Delgado y Zambrano, 2003) y en el cantón Rocafuerte, zona centro de esta provincia, la prevalencia alcanza el 38,57% en vacas de ordeño (Avellán et al., 2019).

Cuadro 1. Microorganismos contagiosos y ambientales de mastitis bovina

M. contagiosos	Referencia bibliográfica
<i>Staphylococcus aureus</i>	Zadoks (2002) Aguilar et al. (2014)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rossitto et al. (2002)
<i>Mycoplasma spp</i>	Zadoks et al. (2011)
M. ambientales	Referencia bibliográfica
<i>Escherichia coli</i>	Rossitto et al. (2002)
<i>Klebsiella spp</i>	Bedolla et al. (2007)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Bolaños, (2012)
<i>Streptococcus uberis</i>	Raspanti et al. (2016)
<i>Enterococcus spp</i>	Castañeda et al. (2013)

Mastitis en la leche. - En el cuadro 1, se indican algunas bacterias causantes de mastitis bovina, que están presentes en la leche, alteran su calidad y propiedades; entre estos microorganismos se encuentran los *Mycoplasmas spp*, que carecen de pared celular y son muy resistentes a las condiciones ambientales. La afectación con estos agentes se traduce en una disminución repentina de la producción y calidad de la leche, también porque la infección no responde a un tratamiento antibiótico específico y su propagación se puede dar de forma muy rápida (Butler et al., 2000). Otro

agente infeccioso es, *E. coli*, bacteria ambiental causante de mastitis subclínica y clínica que produce manifestaciones sistémicas, leves, moderadas o severas en vacas en periodo seco o en producción, generando problemas en salud pública, porque dichos microorganismos pueden ser transmitidos al ser humano a través de la leche (Cely y Meneses, 2004). Reinemann, (2012). El control de estos microorganismos, cuando son detectados, conlleva al uso indiscriminado de antibacterianos, pudiendo crear resistencias por sus mutaciones y conducir a ineficacias en el tratamiento con las penicilinas que son bactericidas susceptibles de ser destruidos por la acción de las enzimas b-lactamasas producidas por las bacterias (Wright, 1999 y Penicillin-Mechanism, 2003).

La necesidad de minimizar los riesgos de toxicidad y resistencia bacteriana en el uso de antibióticos para el control de los microorganismos causantes de la mastitis bovina, hace que el presente trabajo se proponga potenciar el efecto del extracto de orégano (*Origanum vulgare* L) que son aceites esenciales naturales, con propiedades antibacterianas, obtenidos de vegetales que crecen de manera silvestre. Garay y Torrez (2015), evaluaron la actividad antibacteriana del aceite de orégano *in vitro*, en cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* y se concluyó que el aceite esencial de las hojas de orégano, tiene efecto antibacteriano sobre estas bacterias, efecto que podría mejorar si se lo emulsiona. La finalidad de una emulsión es lograr que los compuestos de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica coexistan de manera más estable (Hsieh et al., 2006), lo que se logra con la disminución de la tensión superficial entre dos líquidos inmiscibles y la disminución del tamaño de gota, con la utilización de emulgentes, lo que además mejora el transporte de moléculas activas a través de las membranas biológicas y aumenta la relación superficie área/volumen, conduciendo a una mejorada funcionalidad, como plantea Salvia-Trujillo et al. (2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de la investigación.- Se efectuó en el Campus Politécnico de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, ubicada en el sitio El Limón, entre las coordenadas 0° 49' 23" Latitud Sur; 80° 11' 01" Longitud Oeste y una altitud de 15 msnm, en el cantón Bolívar provincia de Manabí. Para el ensayo se consideraron vacas de la unidad de producción bovina de esta universidad y dos hatos ganaderos de la localidad.

Material experimental. - Se analizaron 44 muestras de leche de igual número de cuarterones diagnosticados con mastitis bovina mediante CMT y confirmadas por CCS y UFC/mL, en medios de cultivo agar Mackonkey y manitol para identificación de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente.

Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado con arreglo factorial 2x2 representado por: métodos de elaboración del extracto acuoso de orégano (ultrasonido y agitación magnética) y concentraciones de compuestos fenólicos del extracto acuoso (12 y 14%). Las variables medidas fueron: conteo de células somáticas (CCS) y unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Procedimiento.- Se recolectaron ramas con hojas de orégano del entorno y seleccionaron las de mejor estado (tiernas, fresca y sin daños), se lavaron con agua de la llave y destilada, luego se secó a temperatura ambiente interna de 25-30 grados centígrados. El extracto se obtuvo mediante el método de destilación con arrastre de vapor (Günther, 1948), con un equipo de destilación de material de vidrio y caucho acoplado a una fuente térmica, armado y operado en el laboratorio de Química de la ESPAM MFL, se emulsionó el extracto de orégano con goma arábica al 0,25% y tween 80 al 0,75% p/p, disueltos en extractos con concentraciones de 12 y 14% de compuestos fenólicos en vasos de vidrio de 250 mL y por agitación magnética con una barra magnética en un equipo calentador-agitador modelo HSD 180 durante 15 minutos a 3500 rpm. La agitación magnética sigue siendo la opción más conveniente para elaborar suspensiones (Jong *et al.*, 2013) y además, por cavitación con un equipo de ultrasonido Chendke y Fogler (1975), modelo VWR 75T. La actividad antibacteriana del extracto se determinó previa aplicación en las ubres de 5 mL vía intramamaria con cánulas de acero inoxidable, por el método semicuantitativo de incorporación en placa de cultivo y sembrado en agar por estrías continuas. El medio de cultivo empleado fue agar Macconkey y Manitol, esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min. El agar sal manitol es una fórmula diseñada por Chapman, (1945), para la diferenciación de estafilococos positivos a la coagulasa (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*) de los estafilococos negativos a la coagulasa, (Bannerman, 2003). Se realizaron las pruebas confirmativas de los microorganismos antes de cada aplicación intramamaria del extracto emulsionado de orégano. Las muestras de leche se inocularon en medio agarizado, previamente fundido, enfriado a 45°C y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación se efectuó la lectura de las UFC/mL mediante un contador digital. Para los ensayos de conteo de células somáticas, (Sixtos, 2011), se recabaron las muestras con protocolos de asepsia, en viales que contenían el conservante bromopol y enviadas al laboratorio de la universidad Politécnica Salesiana. La metodología que se utilizó es la ISO13366- 2/IDF148-2/2006.

Análisis estadístico.- Los resultados obtenidos de las observaciones de las variables concentración (12 y 14%) y métodos (ultrasonido y agitación magnética), se analizaron a través del análisis de varianza. Previamente se comprobó la normalidad de los datos (Prueba Shapiro-

Wilks) y la homogeneidad de varianza (Prueba de Bartlett).

Se realizó pruebas de comparación de medias al 5% (Tukey) en las fuentes de variación que resultaron significativos, estadísticamente.

Se empleó el software estadístico SAS Versión 9.4 (2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los ensayos de 44 muestras de leche de vacas con mastitis, para UFC/mL de *Staphylococcus aureus* presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) para el método del ultrasonido y agitación magnética, no así, para UFC/mL de *E. coli*, de igual forma presentó diferencias estadísticas para el CCS por el método del ultrasonido; no así, para el de agitación magnética a 3500 rpm, como lo muestra el cuadro 2. Al respecto Ramírez *et al.* (2002) indican que en emulsiones el diámetro de gota está en relación con la velocidad de agitación, es como decir que el tamaño de las gotas depende de la agitación. El mismo autor ensayó con 2000 rpm con un tamaño de gota de cerca de 30 micras, mientras que a 8000 rpm alrededor de 9 micras, en el presente ensayo se realizó a 3500 rpm en el método de agitación magnética.

Cuadro 2. Variables en estudio

Variables	MS	F	P
Concentraciones: 12 y 14%	5,420E±12	1,36	0,2497
Métodos: ultrasonido y agitación magnética	165,9E±13	4,18	0,0476

Las bacterias ambientales, cuyo reservorio es el ambiente donde permanecen los animales y no las glándulas mamarias infectadas, son *Streptococcus ambientales* y en menor medida los coliformes (Soca *et al.*, 2005). Así mismo, investigadores determinaron que *S. aureus* es la principal causa de infección intramamaria en los rumiantes (Mullarky *et al.*, 2001; Zadoks, 2002), por lo que se le considera el agente causal más importante y frecuente de la mastitis bovina (Sordelli *et al.*, 2000; Tollersrud, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2001). No obstante, los microorganismos contagiosos, tienen su hábitat en la glándula mamaria bovina y se transmiten generalmente durante el ordeño de las vacas.

El uso del método ultrasonido mostró mejor efectividad en la emulsión al incrementar la actividad antibacteriana del extracto, por lo que se considera una técnica de procesamiento sustentable, debido a que típicamente emplea menos tiempo, agua y energía (Chemat *et al.*, 2011). Por otra parte (Kaltsa *et al.*, 2014), consiguieron reducir el tamaño del glóbulo en emulsiones con aislado de proteína de suero y goma xantana aumentando la potencia ultrasónica o la duración del tratamiento con ultrasonidos. Lad y Murthy, (2012) disminuyeron el

tamaño medio del glóbulo en emulsiones con proteína de leche de coco después del tratamiento con ultrasonidos. Infusiones tanto de aceites esenciales como de extractos de plantas (ya sean acuosos o etanólico) se pueden usar en formulaciones antimicrobianas ya que tienen actividad contra cepas de bacterias gram positivas y negativas (Nazia *et al.*, 2007, Saeed y Tariq, 2009 y Martins *et al.*, 2014). La disminución en el conteo de células somáticas y la disminución de las UFC/mL para *S. aureus*, indican la actividad antibacteriana del extracto acuoso emulsionado de orégano. Esta acción en los aceites esenciales se debe a su capacidad para descomponer la pared celular bacteriana y por lo tanto da como resultado la destrucción de las células (Ghosh *et al.*, 2012). Por consiguiente, al considerar la emulsión del extracto y su funcionalidad debido a la disminución del tamaño de gota en una mezcla oleosa y acuosa, presentan una mayor reactividad química y son más bioactivas que las partículas más grandes; por su tamaño tienen mejor acceso a cualquier cuerpo y por tanto la probabilidad de entrar en células, tejidos y órganos (Lugo-Medina *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Promedio de células somáticas para los dos métodos de elaboración de la emulsión del extracto de orégano

Métodos	Promedios de células somáticas	Error Estándar	Ámbito
Ultrasonido	1,94	± 3,18	A
Agitación Magnética	3,16	± 4.0	B

El cuadro 3 denota que la media de los grupos, disminuye en el método ultrasonido (A) en relación al de agitación magnética (B), lo que demuestra que si existe diferencia significativa para el conteo de células somáticas.

Cuadro 4. Promedios de células somáticas en las dos concentraciones de compuesto fenólicos en el extracto de orégano, para agitación magnética

Concentraciones	Promedios de células somáticas	Error Estándar	Ámbito
12%	1,73 x 10 ⁶	± 546964	A
14%	1,915 x10 ⁶	± 466194	A

En el cuadro 4, se hace referencia a que las concentraciones utilizadas no influyeron estadísticamente en las variables concentraciones (12 y 14%) de compuestos fenólicos del extracto acuoso en la mastitis bovina; sin embargo, el efecto antibacteriano del extracto de orégano presentó la disminución en el CSS y UFC/mL, posterior a la aplicación del extracto, como se observa en las figura 1 y 2 de medios de cultivos microbianos, antes y después de la aplicación del extracto de orégano emulsionado. La actividad

antibacteriana de los aceites esenciales se debe a su capacidad para descomponer la pared celular bacteriana y, por lo tanto, da como resultado la destrucción de las células (Ghosh *et al.*, 2012).

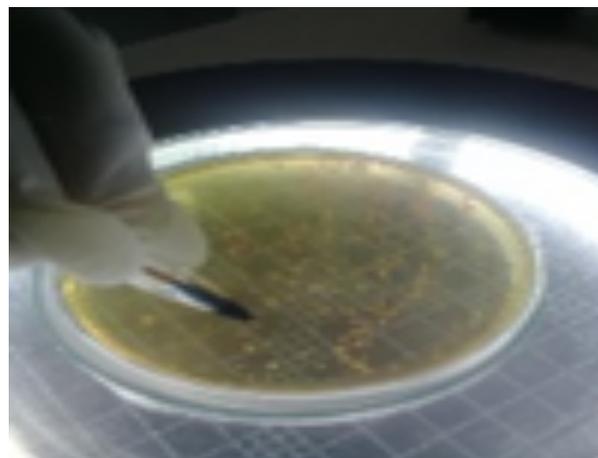


Figura 1. Colonias en cultivo de manitol antes del tratamiento

En la figura 1 se observa la placa con colonias de bacterias, luego de 24-48 horas a (37°C) y en el medio su cambio de coloración con las colonias circulares de gris a amarillo dorado intenso. Los estafilococos coagulasa (+) (*S. aureus*), producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los estafilococos negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no provocan cambios en el color del indicador rojo fenol (Chapman, 1945), se observan en agrupaciones que asemejan racimos de uva.

La figura 2 muestra la disminución de las unidades formadoras de colonias en el medio de cultivo manitol, donde no se observa cambios de coloración después de la tercera aplicación del extracto de orégano emulsionado.

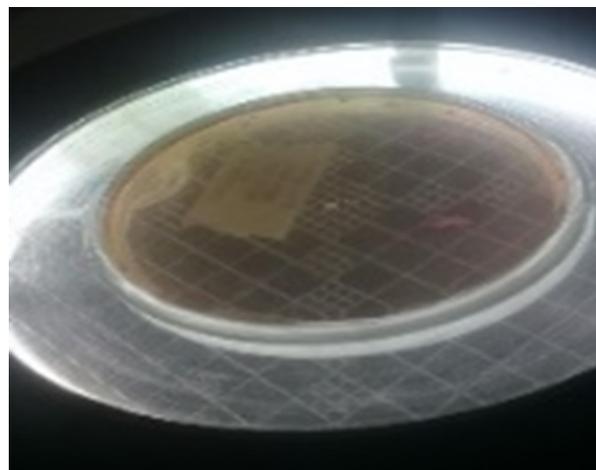


Figura 2. Colonias en el medio de cultivo manitol después del tratamiento

La emulsión del extracto mediante el método de ultrasonido logró mejor funcionalidad, al disminuir el tamaño de las gotas de grasas, debido al efecto de cavitación, lo cual logra incrementar la actividad bacteriostática del extracto. La reducción en el tamaño de partícula no solo mejora el transporte de moléculas activas a través de las membranas biológicas, sino que además aumenta la relación de superficie área/volumen, lo que conduce a una funcionalidad mejorada (Salvia-Trujillo *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

La aplicación intramamaria del extracto acuoso emulsionado de orégano *Origanum vulgare* en vacas infectadas, presentó disminución del CCS y de *S. aureus* con una diferencia estadística ($p < 0,05$) para el método del ultrasonido, determinando el efecto inhibitorio sobre estas bacterias en la mastitis bovina.

LITERATURA CITADA

Avellán, R., Zambrano, M., De La Cruz, L., Cedeño, C., Delgado H., Rezabala, P. y Macías Y. 2019. Revista Amazónica y Ciencia y Tecnología, Ene. - Abr. Volumen 8 (1):62-70.

Bannerman, T.L. 2003. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray, P. R., E. J.

Bedolla, C., Castañeda, V. y Wolter, W. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina, Revista electrónica de veterinaria REDVET, 8(9).

Bolaños, F.O. 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. REDVET; 13(11).

Butler J., S.A. Sickles. C. Jeanns y Rosebusch R., 2000. Pasteurization of discard mycoplasma mastitic milk used to feeds calve: thermal effects on various mycoplasma. J. Dairy Sc 83: 2285-2288.

Cely, M.; Meneses, R. 2004. Aislamiento e identificación de bacterias presentes en caso de mastitis subclínica en hatos lecheros en el municipio de Belén. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Tunja, Boyacá. Trabajo de Grado. p 68.

Ceron-Muñoz M, H Tonhati, J Duarte, J Oliveira, M Muñoz-Berrocal y H Jurado-Gámez. 2002. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. J. Dairy Sci.85:2885-2889.

Chapman, G.H. 1945. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. J. Bacteriol. 50:201-203.

Chemat F., Zill-e-Huma, y Muhammed Kamran Khan. 2011. Applications of ultrasound in food technology. Processing, preservation and extraction. Ultrasonic Sonochemistry 18(4):813-835

Chendke, P.K. y H.S. Fogler. 1975. Macrosonics in industry: 4. Chemical processing. Ultrasonics. 13(31-37).

Castañeda, V.H., Jäger, S., Wolter, W., Zschock, M. y Castañeda VMA., El Sayed, A . 2013. El aislamiento y la identificación de los principales patógenos de mastitis en México. Archivo Brasileño de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 65(2):377-382

Cotrino, B.V. 2003. Como se determina la calidad microbiológica de la leche cruda. Consultado <http://www.lmvltda.com/cms/index.php?section=19>.

Garay, M. H., y Torrez, M., I. 2015 Efecto antibacteriano del aceite esencial de Origanum vulgare L. orégano sobre cepas de Escherichia coli y Staphylococcus aureus, in vitro. Cajamarca.

Ghosh, V.; Mukharjee, y N. Chandasekaran. 2012. Mustard oil microemulsion formulation and evaluation of bacterial activity Int. J. Pharm. Pharm. Sci 4(4):497-500.

Delgado, H. y Zambrano, L. 2003. Identificación de los agentes causales de la mastitis en bovinos lecheros en los cantones: Montecristi, Rocafuerte, Portoviejo y Santa Ana, mediante cultivo en agar nutritivo y agar MacConkey y reconocimiento por tinción de Gram. Tesis Dr. Medicina Veterinaria y Zootecnia. UTM. Portoviejo-Manabí. EC. p.81.

ESPAC (Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua). 2014. Obtenido de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014_2015/2014/Presentacion%20de%20resultados%20ESPAC_2014.pdf

Fitzgerald, R. J., Monday, S. R., Foster, T. J., Bohach, G. A., Hartigan, P. J., Meaney, W. J. y Smoh, C. J. 2001. Characterization of a Putative Pathogenicity Island from Bovine Staphylococcus aureus Encoding Multiple Superantigens. Journal of Bacteriology. 183:63-70.

- Günther, E. 1948. The essential oils: History and origin in plants production analysis. Krieger Publishing, New York, 235-240.
- Hsieh YC, Choudhry M. y Yu HP. 2006. Inhibition on cardiac PGC-1 alpha expression abolishes ERbeta agonist-mediated cardio protection following trahuma-hemorrhage et all, 2006. FASEB J 20:1109-1117.
- Kaltsa, O., Gatsi, I., Yanniotis, S. y Mandala, I. 2014. Influence of ultrasonication parameters on physical characteristics of olive oil model emulsions containing xanthan. Food and Bioprocess Technology, 7:2038-2049. doi:10.1007/s11947-014-1266-1.
- Lad, V. N., y Murthy, Z. V. P. 2012. Enhancing the stability of oil-in-water emulsions emulsified by coconut milk protein with the application of acoustic cavitation. Industrial & Engineering Chemistry Research, 51:4222-4229. doi:10.1021/ie202764.
- Lugo-Medina, Garcia-Gutierrez y Ruelas-Ayala. 2010. Nanotecnologías y encapsulación de plaguicidas.
- Martins, N., Barros, L., Santos, C., Henriques, M., Silva, S. y Ferreira, I. 2014. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. Food Chemistry, 158:73-80. doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.099.
- Mullarky I. K., Su, C., Frieze, N., Park, Y. H. y Sordillo, L. M. 2001. *Staphylococcus aureus* agr Genotypes with Enterotoxin Production Capabilities Can Resist Neutrophil Bactericidal Activity. Infection and Immunity. 69:45-51.
- Nazia Masood Ahmed Chaudhry, Sabahat Saeed and Perween Tariq. 2007. Antibacterial effects of oregano (*Origanum vulgare*) against gram negative
- OEA (Organización de Estados Americanos). 2003. Producción higiénica de leche cruda. Capítulo 5: Mastitis. Publicaciones OEA/GTZ.
- Penicillin-Mechanism. Chemical Society. 2002 HTML (Online) URL. [http : // www . Chemsoc . org / exemplarchem / entries . stanley / 06_Mechanism / Mechanism . html](http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/stanley/06_Mechanism/Mechanism.html)
- Radostis, O. 2001. Medicina Veterinaria tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Madrid, España. Traducción del inglés por Isabel Álvarez et al. 9ª Edición. Editorial Interamericana. Vol. 1. pp 711-746.
- Ramírez, M., Bullón J., Anderez, J., Mira, I. y Salager, J. 2002. Drop size distribution bimodality and its effect on O/W emulsion viscosity. J. Dispersion Sci. Technology, 23 (1/3):309-321.
- Raspanti, C., Bonetto, C., Vissio, C., Pellegrino, M., Reinoso, E.B., Dieser, S.A., Bogni, C., Larriestra, A., Odierno y L.M. 2016. Prevalencia y susceptibilidad a los antibióticos de coagulasa negativa *Staphylococcus* especies de mastitis subclínica bovina en ganado vacuno lechero en la región central de Argentina. Revista argentina de microbiología, 48(1):50-56
- Reinenmann, D. J. 2012. The smart position teat codition. Proc. NZ. Milk quality conference. Hamilton NZ. June 18 – 19, 2012 p. 141-8.
- Rossitto, P.V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Ruiz, K., Watts, J.L. y Cullor, J.S. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococcus isolated from bovine mastitis in central California dairies. J. Dairy Sci. 85: 132-138.
- Saeed S y Tariq P. 2009. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram-positive bacteria. Pakistan Journal of Pharmaceutic Science. 22: 421-424.
- Salvia-Trujillo, L.; Rojas-Grau, A.; Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. 2015. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of foodgrade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. Food Hydrocolloids, 43: 547 – 556.
- Sixtos, E. 2011. Frecuencia y etiología de la mastitis bovina en Cherán, Michoacán. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Soca, PM; Suarez, YE; Soca, PM; Rivero, J; Fuentes, CM y Alberto, PC. 2005. Comparación de la Incidencia Epizootiológica de la Mastitis Clínica en Dos Rebaños Lecheros Después del Uso del Agua para la Antisepsia Final del Pezón. Revista Electrónica de Veterinaria VI(3): 1-11
- Sordelli, D. O., Buzzola, F. R., Gomez, M. I., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E. Catalano, M., Reitz, A. J., Tollersrud, T., Denamiel, G., Jeric, P. y Lee, J. C. 2000. Capsule Expression by Bovine Isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: Genetic and Epidemiologic Analyses. Journal of Clinical Microbiology. 38: 846-850.
- Tilley, J. M. A. and R. A. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Br. Grassal. Soc.18:104.

- Tollersrud, T. 2001. Staphylococcus aureus mastitis. Bacterial characteristics and host immune responses. Thesis of Doctor Medicinae Veterinariae. National Veterinary Institute. Oslo; 9. robiology. 38: 846-850.
- Wellenberg, G. J., van der Poel, W. H. M. y Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Vet. Microbiol, 88: 27-45.
- Wright, AJ. Mayo Clin Proc. 1999. Division of infectious diseases and internal Medicine, Review. Mayo Clinical Rochester. Minnesota 55905. USA. Mar; 74(3):290-307.
- Yang, S.-H. Kim, J.-M. Lim y Yi, G.-R. 2008. Synthesis and assembly of structured colloidal particles, Journal of Materials Chemistry, 18.
- Zadoks, R.N. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of Staphylococcus aureus and Streptococcus uberis mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University Medicine: 2-3:239.
- Zadoks RN., Griffiths HM. Munoz MA, Ahlstrom C, Bennett GJ, Thomas E y Schukken YH. 2011 Dairy Sci. Feb; 94:1045-51. Sources of Klebsiella and Raoultella species on dairy farms: be careful where you walk.