Assiut University web-site: www.aun.edu.eg

COMPARISON BETWEEN IRAQI AND EUROPEAN ETHER EXTRACT OF PROPOLIS ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM MINCED MEAT

T.A. ABDULLAH
Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine,
University of Mosul, Mosul, Iraq.

Received: 24 July 2016; **Accepted:** 19 September 2016

ABSTRACT

This study was conducted for isolation and identification of *staphylococcus aureus* from minced meat and evaluation of sensitivity of these strains to antibiotics. Also, this study aimed to assess the activity of Iraqi ethanol extract of propolis (EEP) against *S.aureus* compared to European ethanol extract of propolis at 10%, 15%. 20% and 30% to both types of propolis. Thirteen samples of minced meat revealed positive results for isolation of *S.aureus* with a ratio of (21%). Iraqi EEP showed antibacterial activity against *S.aureus* at 3 µg with average of inhibition zone 18.84±0.256 compared to European EEP which gave inhibition zone against the growth of *S.aureus* 12.84±0.354 at same concentration. Other concentration of EEP gave low sensitivity against *S. aureus* strains which mean that Iraqi EEP have a high activity against these strains related to flavonoides and phenols activity presented in Iraqi EEP. All strains of *S.aureus* isolated from minced meat showed high sensitivity to Cephtriaxon at 10 µg while all of them showed high resistance to Methacillin, Gentamycin and Penicillin at 10 µg concentration.

Key words: *Iraqi, European ether extract, Propolis, Staphylococcus aureus, Minced meat*

مقارنة تأثير مستخلص العكبر العراقي والأوروبي على جراثيم المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من اللحوم المفرومة

تقى أحمد عبد الله

تم في هذه الدراسة عزل وتشخيص جراثيم المكورات العنقودية الذهبية من اللحوم المفرومة واختبرت حساسية هذه الجراثيم لبعض المضادات الحيوية وتم البحث عن فعالية المستخلص الكحولي للعكبر العراقي المضادة لجراثيم المكورات العنقودية الذهبية مقارنة بفعالية المستخلص الكحولي للعكبر الأوروبي المضادة لنفس الجرثومة وبالتراكيز (30%,20%,15%,10%) لكلا نوعي العكبر. أعطت 13 عينة وبنسبة 21% نتيجة موجبة لعزل جراثيم المكورات العنقودية الذهبية من اللحوم المفرومة. وأظهر المستخلص الكحولي للعكبر العراقي فعالية مضادة لعترات جراثيم المكورات العنقودية الذهبيةالمعزولة من هذه اللحوم بالتركيز 3 مايكروغرام حيث أعطت قطرا تثبيطيا لنمو هذه الجراثيم بمعدل 0.256 ± 18.84 مقارنة بالعكبر الأوروبي الذي أعطى قطرا تثبيطيا لنمو عترات المكورات العنقودية الذهبية 0.354 ±12.84 عند التركيز نفسه، وكانت حساسية هذه الجراثيم أقل للتراكيز الأخرى من المستخلص الكحولي للعكبر مما يدلل على أن المستخلص الكحولي للعكبر العراقي أكثر فعالية ضد جراثيم المكورات العنقودية الذهبية والذي قد يعزى إلى فعالية مركبات الفلافونيدات والفينولات الداخلة ضمن مكونات العكبر العراقي والتي لها فعالية مضادة للجراثيم. وكانت جميع عترات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من اللحوم المفرومة في هذه الدراسة حساسة للمضاد الحيوي السفترياكسون بالتركيز 10 مايكروغرام في حين كانت هذه الجراثيم مقاومة للمضاد الحيوي الميثاسلين بالتركيز 10 مايكروغرام وكذلك للمضاد الحيوي الجنتامايسين والبنسلين بالتركيز 10 مايكروغرام لكل منهما.

INTRODUCTION
مقـدمـة

العكبر مادة راتنجية معقدة التركيب تجمع بواسطة نحل العسل من مصادر نباتية مختلفة ومنذ القدم استخدم العكبر في علاج الكثير من الأمراض ولازال يستخدم الى يومنا هذا (Cardile *et al.*, 2003; Castaldo and Capasso, 2002) لما له من صفات بايولوجية مضادة للجراثيم والفطريات والفيروسات ومضاد للسرطان والالتهابات وكمضاد للاكسدة

Corresponding author: Dr. T. A. ABDULLAH
E-mail address: montaha_hassan99@yahoo.com
Present address: Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq.

(Wang *et al*., 2004; Kartal *et al*., 2003; Prytzyk *et al*., 2003; Akao *et al*., 2003) ان تـأثير العكبـر المضـاد للجراثيم يعـود الـى احتوائـه علـى بعـض المركبـات الفعالـة مثـل الفلافونيـدات والفينـولات والاسـترات (flavone, flavonone, phenolic acid, polyphenols (Ishida *et al*., 2011) ومن بين المركبـات الفعالـة التـي يحتويهـا العكبـر مركـب caffic acid phenethylester (CAPE) والـذي لـه فعاليـة تثبيطيـة للــ Eicosanoids وتثبيط حـامض النيتريك (Cilli *et al*, 2004) وفعاليـة مضـادة للجراثيم (Celik *et al*., 2007; Havsteen, 2002). وبينت دراسة اجريت على العكبـر العراقي ان العكبـر العراقـي يحتـــوي علـــى الفلافونيـــدات ومـــادة بينزيفينـــون benzophenon بتـقـنيـــة (TLC) Thin Layer Chromatography (AL-Nema, 2011) وبين (Raghukumar *et al*.,2010; Kilic *et al*., 2005) تـأثير العكبر علـى المكورات العنقوديـة المقـاومة للميثاسلين Methacilline resist *staphylococcus aureus* (MRSA) ويختلـف العكبر فـي تـاثيـره ولـونـه ورائحتـه تـبعا لمـنشئه الجغـرافـي ونـوع النبـات الـذي جمـع منـه العكبـر ومـوسـم جـمعه (Kosalec *et al*., 2004 ; Kosalec *et al*., 2003 ; Bankova *et al*., 2002; Sforcin *et al*., 2000) تعد جراثيم المكورات العنقوديـة الذهبيـة من الجراثيم المهمـة والتـي تـؤثر علـى الصـحة العامـة وخاصـة الأنـواع المقاومـة لبعض المضـــادات الحيويـــة مثـل المـكورات العـنـقوديـــة المـقاومـــة للميثاسليـن MRSA والتي تسبب العديد مـن الإصابات التنفسيـة والجلديـة (Yili, 2010; Web, 2010) وعدت جراثيم المكورات العنقودية الذهبية من أهم جراثيم التسمم الغذائي لكونها تفرز الذيفان المعوي المسبب الرئيسي للتسمم الغذائي .وعزلت (Schlegelova *et al*., 2004) . الهدف من هذه الدراسـة هـو التعـرف علـى مدى التـأثير التثبيطـي للعكبـر العراقـي والعكبـر الأوربـي علـى جـراثيم المكورات العنقودية الذهبية المسببة للتسمم الغذائي المتكرر والناجم عن تلوث اللحوم المفرومة أثناء تداول هذه اللحوم.

MATERIALS AND METHODS
المواد وطرائق البحث

العينات

جمعت 60 عينة من لحوم الأبقار المحلية المفرومة من أسواق مدينة الموصل للكشف عن وجود جراثيم المكورات العنقوديـة الذهبيـة فيها. جمع العكبر العراقي من مناطق مختلفة من محافظة نينوى شملت منطقة الغابات والشيخان وربيعة.

طريقة تحضير المستخلص الكحولي للعكبر:

جمد العكبر وبرش ثم وزن 30 غم من العكبر وأذيب في 70 مل من الكحول الاثيلي بتركيز 95% باستخدام خـلاط وبـدون تسـخين مـن دون تعريضه للضوء لمدة ثلاثة أيام ورشح بقطعة قماش ناعمة ونظيفة و استخدمت اوراق الترشيح للتخلص مـن الشوائب الموجودة في المحلـول وحفظ الراشح فـي قنـاني نظيفـة ذات لـون داكـن بعيـدا عـن الضـوء لمـدة أسـبوع وتـم تبخير الراشـح بجهـاز الاسـتخلاص Rotary للتخلص من الكحول ثم جفد المستخلص باستخدام جهاز Lyophilizer وحضر المستخلص الكحولي للعكبر بـالتراكيز 10% ،15% ،20% ،30% عن طريق إذابته في مادة DMSO (Dimethyl sulfoxide) بدالة حامضية 7 وعقم بالترشيح عبر مرشحات في 0.22 مايكروميتر. أما المستخلص الكحولي للعكبر الأوروبي تم استيراده من شركة W.SEIP الألمانية وأذيب بمادة DMSO للحصول على نفس التراكيز (10%،15% ،20%،30%) وحضرت أقراص الترشيح بقطر 6 ملم ثم غمرت بهذه التراكيز (Lu *et al*., 2005 ; NCCLS, 2004 ; Krell, 1996).

العزل الجرثومي

وضعت عينات اللحم المفروم في ماء الببتون المجهز من شركة Defco وحضنت بدرجة ٣٧ ° م لمدة ساعتين ثم نقلت على الوسط الانتخابي وسط الملح وسكر المانيتول المجهز من شركة Oxoid وحضنت بدرجة ٣٧ ° مل مدة 24– 48 ساعة. اخذت المستعمرات النامية على وسط الملح وسكر المانيتول وصبغت بصبغة كرام للتأكد من شكل وتصبغ الجرثومة وتم إجراء اختبار التجلط test Coagulase على عترات المكورات العنقوديـة الذهبية الناميـة لتوثيـق تشخيـص وجـود المكـورات العنقوديـة الذهبيـة بطريقـة اختبـار الأنبوبـة وتـم الكشـف عـن خميرة التجلط (Kloos and Lambe, 1991; Martin and Myers,1994). حضر المعلق الجرثومي لعترات المكورات العنقودية الذهبية الموجبة لاختبار خميرة التجلط بأخذ مسحة من الزرع الجرثومي ووضعها في مرق الببتون وحضنت لمدة 24 ساعة على درجة حرارة ٣٧°م واخذ التركيز 10^{-1} خلية جرثومية /سم^{٣} ونشرت على وسط أكار المولر هنتون المجهز من شركة Oxoid لاختبار حساسية عترات المكورات العنقودية الذهبية لبعض المضادات الحياتية ووضعت أقراص المضادات الحيوية كالجنتامايسين Gentamycin 10 مايكروغرام والبنسلين Pencilline 10 مايكروغرام والميثاسللين Methacilline 10 مايكروغرام والسفترياكسون Ceftraixon 10 مايكروغرام التي تم تجهيزها من شركة Bioanalyze وحسب طريقة Kribyand Bare المحورة (auer *et al*.,1966) كما وثبتت أقراص العكبر المشبعة بالمستخلص الكحولي لكل من العكبر العراقي والعكبر الأوروبي بالتراكيز 10%،15%،20%،30% لاختبار حساسية عترات جراثيم المكورات العنقودية الذهبية وتركت لتجف ثم حضنت الأطـباق بدرجة ٣٧ م° لمدة 16-18 ساعة وقرئت النتائج بالاعتماد على قطر منطقة التثبيط الجرثومي لكلا النوعين من العكبر وللمضادات الحياتية (Carter and Wise, 2004; Hendrix, 2002).

RESULTS
النتائــــج

عزلت جراثيم المكورات العنقوديـة الذهبيـة منعينـات اللحوم المفرومـة حيث أعطت 13 عينـة نتيجـة موجبـة لعزل جراثيم المكورات العنقودية الذهبية وبنسبة 21 % الجدول (١) وكانت جميع هذه العترات موجبـة لاختبـار تجلط خميرة الــ Coagulase وبينت نتـائج اختبار الحساسية لمستخلص العكبر ان عترات المكورات العنقودية الذهبيـة المعزولـة مـن اللحـوم المفرومـة حساسـة لمستخلص العكبـر

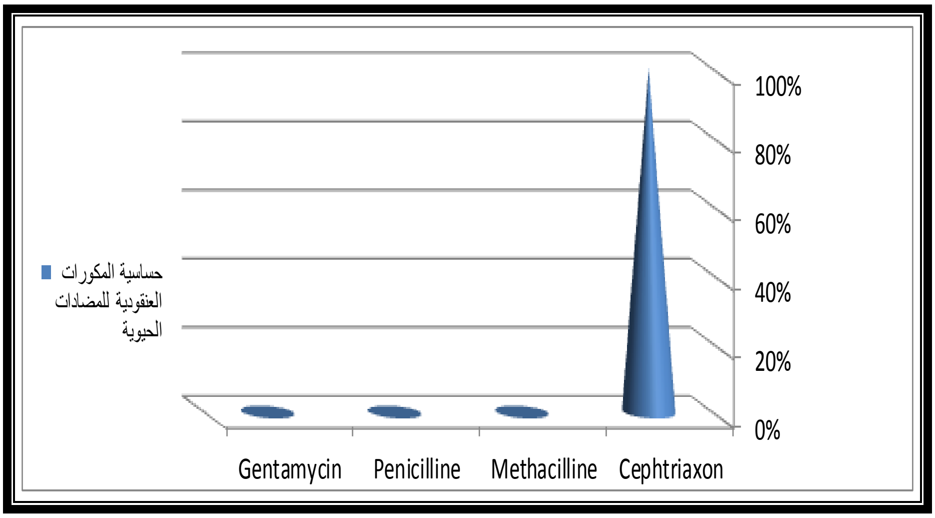
العراقي بالتركيز 3 مايكروغرام حيث بلغ قطر التثبيط فيه لعترات المكورات العنقودية 0.256 ± 18.84 ملم مقارنة بالتركيز 2 مايكروغرام والذي بلغ قطر التثبيط فيه 14.76±0.536 ملم. اما التركيزين 1,1.5 مايكروغرام من مستخلص العكبر العراقي فقد كان قطر التثبيط لكليهما اقل من التركيزين 3 ,2 مايكروغرام اللذان بلغ قطر التثبيط فيهما 13.16±0.427,13.2±0.586ملم على التوالي. أما مستخلص العكبر الأوروبي بالتركيز 3مايكروغرام فقد كان قطر التثبيط لنمو المكورات العنقودية الذهبية 12.84±0.354 ملم مقارنة بالتراكيز 1.5,12, مايكروغرام حيث بلغ قطر التثبيط فيهم9.84,9.48±0.322± 0.360 ±322,9.64. على التتابع. وكانت عترات المكورات العنقودية الذهبية حساسة لمستخلص العكبر العراقي بالتركيز 3 مايكروغرام مقارنة بمستخلص العكبر الاوروبي عند نفس التركيز وكان هذا الاختلاف معنويا عند مستوى معنوية (p<0.05) حيث بلغ قطر التثبيط لمستخلص العكبر العراقي 0.256 ± 18.84 ملم في حين كان قطر التثبيط لنمو المكورات العنقودية الذهبية لمستخلص العكبر الاوروبي12.84±0.354 ملم جدول (٢). وعند الكشف عن حساسية عترات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من اللحوم المفرومة لبعض المضادات الحيوية أظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية أنعزلات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من اللحوم المفرومة مقاومة لكل من المضاد الحيوي الميثاسللين والبنسلين والجنتامايسين بالتركيز 10مايكروغرام وحساسة للمضاد الحيوي السفترياكسونب التركيز10 مايكروغرام شكل (١)

الجدول ١: النسبة المئوية لعزل المكورات العنقودية الذهبية من اللحوم المفرومة.

عدد العينات المفحوصة		عدد العزلات	النسبة المئوية
60	العينات الموجبة	13	21%
	العينات السالبة	47	79%
المجموع		**60**	**100%**

الجدول ٢: معدل قطر تثبيط نمو المكورات العنقودية الذهبية بمستخلص العكبر العراقي والأوروبي.

نوع العكبر	تراكيز العكبر			
	%10	**%15**	**%20**	**%30**
العكبر الاوروبي	9.64±0.36 d	9.84±0.293 d	9.48±0.322 d	12.84±0.354 c
العكبر العراقي	13.16±0.427 c	13.2±0.586 c	14.76±0.536 b	18.84±0.256 a



الشكل (١): حساسية المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من اللحوم المفرومة لبعض المضادات الحياتية

DISCUSSION
المناقشـــة

بلغت نسبة عزل المكورات العنقودية الذهبية من اللحوم المحلية في الدراسة الحالية 21% وكانت هذه النسبة اقل من نسبة عزل المكورات العنقودية الذهبية من لحوم الأبقار والتي بلغت (Gundogan *et al.*, 2005) 46.6% وأقل من نسبة عزل المكورات العنقودية الذهبية من لحوم الأبقار المفرومة 34.14% (Yili, 2010) ويعزى ارتفاع نسبة عزل المكورات العنقودية الذهبية في مجمل هذه البحوث الى عدم توفر الشروط الصحية في محلات تداول وتصنيع وبيع هذه اللحوم الأمر الذي جعلها عرضة للتلوث بالمكورات العنقودية الذهبية المسببة للتسمم الغذائي الناجم عن تناول هذه اللحوم الملوثة (Jablonski and Bohach, 2001). وأعزى بعض الباحثين ارتفاع نسبة عزل المكورات العنقودية الذهبية في لحوم الأبقار المفرومة إلى أن مصدرها المتداولين لهذه اللحوم من العمال والقصابين المصابين بآفات جلدية وعن طريق العطاس والسعال (Jay, 1986) فضلا عن أن مايقارب ٥٠% من الأفراد يحملون هذه الجراثيم بصورة تعايشية وأحيانا قد يكون مصدرها التربة والماء والغبار والهواء (Arbuthnott,1990) وقد يكون مصدر المكورات العنقودية الذهبية بعض أنواع الحيوانات الحقلية كالخيول والكلاب والقطط والتي تكون حاملة لهذه الجراثيم بشكل تحت ألسريري لذا يمكن أن يكون تواجد الحيوانات الحاملة لهذا النوع من الجراثيم احد مصادر التلوث في اللحوم بسبب تواجد الكلاب والقطط في أماكن قريبة من أماكن بيع وتداول هذه اللحوم لذلك تشكل اللحوم المعرضة للتلوث بالمكورات العنقودية الذهبية بعد تصنيعها مصدر خطر على الصحة العامة لمستهلكي هذا النوع من اللحوم (Jablonski and Bohach, 2001) وعند الكشف عن حساسية عترات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من لحوم الأبقار المفرومة لبعض المضادات الحيوية أظهرت هذه العترات حساسية عالية للمضاد الحيوي السفترياكسون بالتركيز 10 مايكروغرام مقارنة بالجنتاميسين والميثاسيللين والبنسلين بنفس التركيز وتعزى زيادة مقاومة هذه الجراثيم للمضادات الحيوية الى استخدام بعض المضادات الحيوية كإضافات غذائية لأعلاف الحيوانات المزرعية ويضمنها الأبقار فضلا عن الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية كعلاج للحيوانات المريضة (Web, 2010) ومن خلال هذه الدراسة سلط الضوء على حساسية المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من لحوم الأبقار المفرومة للمستخلص الكحولي للعكبر بنوعيه العراقي والاوروبي.E.E.P كأحد المواد الفعالة المثبطة لوجود المكورات العنقودية الذهبية حيث اشارت بحوث عديدة الى فعالية مستخلص العكبر المضادة لهذه الجراثيم (Raghukumar *et al.*, 2010; Kilic *et al*, 2005; Fernandes *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2001; Sforcin *et al.*, 2000) فضلا عن ما توصل إليها لباحث (yaghoubi *et al.*, 2007) من ان عترات الجراثيم موجبة الكرام اكثر حساسية للعكبر من عترات الجراثيم سالبة الكرام. وتبين من الدراسة أن عترات المكورات العنقودية الذهبية حساسة لمستخلص العكبر العراقي مقارنة بمستخلص العكبر الاوروبي بالتركيز 3 مايكروغرام حيث بلغ قطر التثبيط للعكبر العراقي 0.256±18.84 وبلغ قطر التثبيط للعكبر الاوروبي 0.354±12.84 وجاءت هذه النتائج متفقة مع دراسات عديدة عن حساسية جراثيم المكورات العنقودية الذهبية لمستخلص العكبر الكحولي (Gonsales *et al.*, 2006; Ivan *et al.*, 2005; Pepeljnjak and Kosalec, 2004; Keskin *et al.*, 2001; Kujumgiev *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1998; Krol *et al.*, 1993; Detoma and Ozin, 1991) وربما تعزى الاختلافات في تأثير العكبر الى تباين مكونات العكبر التي تختلف تبعا للمنشأ الجغرافي ولموسم الجمع فقد اظهر التحليل الكيمياوي لمستخلص العكبر العراقي وجود مركبات الفلافونيدات والفينولات والبنزوفينون بأستخدام تقنية TLC(AL-Nema, 2006) وهذا ما أكده (Budock,1998) الذي توصل الى تباين اختلاف تأثير العكبر المضاد لجراثيم المكورات العنقودية الذهبية تبعا لتركيبه الكيمياوي وجاءت هذه النتائج متفقة مع توصل اليه الباحثين من ان نوعية وكمية المواد التي يتكون منها العكبر تلعب دورا مهما في الفعالية الحيوية للعكبر ضد الجراثيم المسببة للتسمم الغذائي وبضمنها المكورات العنقودية الذهبية (Hikmet and Nazime, 2006; Santos *et al.*, 2002; Hegazi and Abd El Hady, 2001; Hegazi *et al.*, 2000a; Hegazi *et al.*, 2000b; Kujumgiev *et al.*, 1999) ; وفي دراسة أجراها الباحث (Popova *et al.*, 2007) على مستخلص العكبر الكحولي لمناطق مختلفة من اوربا والشرق الاوسط تبين ان مستخلص العكبر يحتوي على الفلافونيدات والتي تضم الفلافونون flavonon والفلافون flavon والفلافونولس flavonols والفينولات التي تقوي وتعزز تأثيرها المثبط لنمو هذه الجراثيم. وفسرت بعض البحوث العلمية الميكانيكيات التي يؤثر من خلالها العكبر على نمو الجراثيم ومنها التأثير المثبط لنمو الجراثيم المتمثل بتأثيره المثبط لانقسام الخلية الجرثومية وتأثيره على غشاء الخلية والسايتوبلازم حيث يؤدي الى انكماش غشاء الخلية ويعمل على تحلل البكتريا من خلال تثبيطه لتصنيع البروتين وتثبط انزيم RNA –Polymarase (Koo *et al.*, 2000; Takaisi and Schilcher, 1994; Ikeno *et al.*, 1991). وقد توصل (El-Bassiony *et al.*, 2012) إلى أن العكبر لا يستخدم فقط في حفظ الغذاء بل في معالجة الأمراض التي تنتج من الإصابة بالمكورات العنقودية الذهبية خاصة العترات المقاومة لبعض المضادات الحيوية وأهمها الميثاسيللين مثل MRSA. وهذا ما أكده الباحث (kilic *et al.*, 2005) من انه بالإمكان اعتماد العكبر كبديل للمضادات الحيوية في علاج الإصابة بجراثيم المكورات العنقودية الذهبية وخاصة العترات المقاومة للميثاسلين MRSA حيث أن العكبر يمنع نمو عترات المكورات العنقودية الذهبية والتي أصبحت أكثر شيوعا في السنوات الحديثة. قد تعود عترات المكورات العنقودية الذهبية التي أظهرت مقاومة تامة للمضاد الحيوي الميثاسيلين إلى نوع MRSA كونها احد مسببات الأمراض التي منشأها الغذاء foodborne disease (Raghukumar *et al.*, 2010).

REFERENCES
المراجع

Akao, Y.; Maruyama, H.; Matsumoto, K.; Ohguchi, K.; Nishizawa, K. Sakamato, T.; Araki, Y.; Mishima, S. and Nozawa, Y. (2003): Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human cell line s. Pharmaceut. Bull. 26(7):1075-1095.

AL-Nema, M.M. (2006): An Analytical and histological study of a new roof canal filling material composed of Iraqi propolis, beeswax and vanillin, P.H.D. thesis The College of Dentistry, University of Baghdad.

Arbuthnott, J.P. (1990): Staphylococcal toxins in human disease. Journal of Applied Bacteriology Supplement,101S-107S .

Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S. and Sabatini, A. (2002): Chemical composition of European propolis: expectedand unexpected results. Z. Naturforsch; 57: 530-533.

Bauer, A.W.; Kirby, W.N.; Sheris, J.C. and Tuck, M. (1966): Antibioticsusceptibility by standard single disc method. Am. J. Clin. Pathol. 36: 493-496.

Burdock, G.A. (1998): Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis), *Food Chem*. Toxicol. 36: 347-363.

Cardile, V.; Panico, A.; Gentile, B.; Borrelli, F. and Russa, A. (2003): Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. Life Sci , 1027-1035.

Carter, GR. and Wise, DG. (2004): Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology.6 thed Iowa State Press. USA. pp: 82- 83.

Castaldo, S. and Capasso, F. (2002): Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia; 73 Suppl 1: 51-56.

Celik, S.; Gorur, S.; Aslantas, O.; Erdogan, S.; Ocak, S. and Hakverdi, S. (2007): Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in *Escherichia coli*induced pyelonephritis in rats. Mol. Cell. Biochem. 297(1-2): 131-138.

Cilli, N.; Barbara, M.; Luana, K. Di-agam, S.M.; Cosmo, R. and Domenico, R. (2004): Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of caffeic acid phenethyl ester in rat plasma and urine. Journal of Chromatography, 810: 129-136.

Detoma, P. and Ozin, O.I. (1991): Propolis activity on microorganism from hospital source. Ann. Microbiol., 41: 231-236 .

El-Bassiony, T.A.; Saad, N.M. and El-Zamkan, M.A. (2012): Study on the antimicrobial activity of Ethanol Extract of Propolis against Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus* in lab prepared Ice – cream. Vet. World, 5 (3): 155-159.

Fernandes, J.A.; Balestrin, E.C.C. and Cunha, M.L.R.S. (2003): Anti–*Staphylococcus aureus* activity of bee propolis extracts prepared with different ethanol concentrations. Rev. Cienc. Farm. 24: 147-152.

Fernandes, J.A.; Leomil, L.; Fernandes, A.A.H. and Sforcin, J.M. (2001): The antibacterial activity of propolis produced by *Apismellifera* L. and Brazilian stingless bees. J. Venom. Anim. Toxins 7: 173-182.

Gonsales, G.Z.1.; Orsi, R.O.1.; Fernandes Junior, A.II.; Rodrigues, P.I and Funari, S.R.C.I. (2006): Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis vol.12 (20): 276-284.

Gundogan, N.; Citak, S.; Yucel, N. and Devren, N. (2005): A noteonthe incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. Meat sci. 69:807-810.

Havsteen, B. (2002): The biochemistry and medicinal significance of flavonoids. Pharmacol Therapeu. 96: 67-202.

Hegazi, A.G.; Abd El Hady, F.K. and Abd Allah, F.A.M. (2000a): Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. Z. Naturforsch. 55. 71-75.

Hegazi, A. and Abd El Hady, F. (2001): Egyptian propolis: 1. Anti antimicrobial activity and chemical composition of upper Egypt propolis. Z. Naturforsch; 56(1-2): 82-8.

Hegazi, A.G.; Farghali, A.A. and Abd El Hady, F.K. (2000b): Antiviral activity and chemical composition of European and Egyptian propolis In: International Conference of Propolis Argentina, September: 99.

Hendrix, CM. (2002): Laboratory Procedures for Veterinary Technicians. 4th ed Mosby, USA.: 217-218.

Hikmet, K. and Nazime, M. (2006): Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. African Journal of Biotechnology. 5(11):1151-1153.

Ikeno, K.; Ikeno, T. and Miyazawa, C. (1991): Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res 25: 347-351.

Ishida, V.F.C.G.; Negri, A.; Salatino, and Bandeira, M.F.C.L. (2011): "Anewtype of Brazilian propolis: prenylatedbenzophenonesinpropolis from Amazonanects against cariogenicbacteria," Food Chemistry. 125 (3): 966–972.

Ivan, K.M.; Pepeljnjak, S.; Bakmaz, M. and Vladmir-Knezevic, S. (2005): Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta Pharm. 55: 423-30.

Jablonski, L.M. and Bohach, G. (2001): Staphylococcus aureus. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montvill, Food microbiology: Fundamentals and frontiers. Washington. DC: ASM Press.

Jay, J. (1986): Staphylococcal gastroenteritis. In modern food microbiology (3rded.) New York: Van Nostrand Reinhold. 437-458.

Kartal, M.; Yildiz, S.; Kaya, S.; Kurucu, S. and Topcu, G. (2003): Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. J. Ethnopharmacol. 86: 69-73.

Keskin, N.; Hazir, S.; Baser, K.H. and Kurkcuoglu, M. (2001): Antibacterial activity and chemical composition of Turkey propolis. Z Naturforsch. 56(11-12): 1112-1115.

Kilic, A.; Baysallar, M.; Besirbellioglu, B.; Salih, B.; Sorkun, K. and Tanyuksel, M. (2005): In vitro antimicrobial activity of propolis against -methicillin-resistant *S.aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Annals of Microbiol. 55:113-117.

Kloos, W.E. and Lambe, D.W. (1991): Staphylococcus. in: Manual of Clinical Microbiology. A.balows, W.J.; Hausler, K.; Herrman, H.; Isenberg and H.J. Shadomy. American Society for Microbiology. Washington, DC. 222-237.

Koo, H.; Rosalen, P.L.; Cury, J.A.; Ambrosano, G.M.B.; Murata, R.M. and Yatsuda, R.; (2000): Effect of a new variety *Apismellifera* propolis on mutans *Streptococci*. Curr Microbiology; 41:192-4.

Kosalec, I.; Bakmas, M. and Pepeljnjak, S. (2003): Analysis of propolis from continental and Adriatic regions of Croatia. Aeta pharm. 53:275-285.

Kosalec, I.; Bakmaz, M.; Vladimir-Knezevic, S. and Pepeljnjak, S. (2004): Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia, *Acta Pharm*. 54: 65-72.

Krell, R. (1996): Value added products from beekeeping FAO Agricultural Services Bulletin No. 124. Chapter V. http://www.fao.org/docrep/w0076e/w 0076e00.htm.

Krol, W.; Scheller, S.; Shani, J.; Pietsz, G. and Czuba, Z. (1993): Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphvlococcus aureus*. Arzneimittel-forsch 43: 607-609.

Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R. and Propov, S. (1999): Antibacterial, antifungaland antiviral activity of propolis of different geographic origin. Ethnopharmacol. 63(3): 235-40.

Lu, L.; Chen, Y. and Chou, Ch. (2005): Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. Inter. J. Food Microbiology.102: 213-220 .

Martin, S.E. and Myers, E.R. (1994): Staphylococcus aureus. in: Food borne Disease Hand book. Diseases Caused by bacteria. Vol.1.Y.H. Hui, J.R. Gorham, K.D. Murrell and D.O. Cliver, Marcel Dekker Inc., New York. NY. 345-394.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS. (2004): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 14th informational supplement Wayne, PA, USA. 24(1): M100-S14.

Park, Y.K.; Koo, M.H.; Abreu, J.A.S.; Ikegaki, M.; Cury, J.A. and Rosalen, P.L. (1998): Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. Curr.Microbiol. 36:24-28.

Pepeljnjak, S. and Kosalec, I. (2004): Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, Enterococcus spp. and *pseudomonas aeruginosa*. FEMS. Microbial. Lett. 240:111-116.

Popova, M.P.; Bankova, V.S.; Bogdano, S.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Marcazzan, G.L. and Sabatin, A.G. (2007): Chemical characteristics of popular type propolis of different geographic origin. Apidologie 38, 306-311.

Prytzyk, E.; Dantas, A.P.; Salomao, K.; Pereira, A.S.; Bankova, V.S.; DeCastro, S.L. and Aquino-Neto, F.R. (2003): Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. J. Ethnopharmacol. 88:189-193.

Raghukumar, R.; Vali, L.; Watson, D.; Fearnley, J. and Seidel, V. (2010): Antimethicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) Activity of pacific propolis and Isolatedprenylflavanones. Phytother. Res. (www.interscience. Wiley.com) DOI:10.1002/prt.3096.

Santos, F.A.; Bastos, E.M.A.; Uzeda, B.; Carvalho, M.A.R.; Farias, E.S.A. and Braga, F.C. (2002): Antimicrobial activity of Brazilian propolis and fractions against oral Anaerobic bacteria. Ethnopharmacol. 80:1-7.

Schlegelova, J.; Napravnikova, E.; Dendis, M.; Horvath, R.; Benedik, J. and Babak, V. (2004): Beef carcass contamination in slaughterhouse and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates of selected microbial species. Meat Science. 66: 557-565.

Sforcin, J.M.; Femandes, J.A.; Lopes, C.A.M.; Bankova, V. and Funari, S.R.C. (2000): Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J. Ethnopharmacol. 73: 243-249.

Takaisi-Kikuni, N.B. and Schilcher, H. (1994): Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta. Medica* 60:222-227.

Wang, B.J.; Lien, Y.H. and Yu, Z.R. (2004): Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. Food Chem. 86: 237-243.

Webmd. (2010): http:// www. Webmd.com/skin-problems –and –treatments /understanding –mrsa-mithacillin-resistant-*staphylococcus aureus*.

Yaghobi, S.M.J.; Ghorbani, G.R.; Soleimanian, Z.S. and Satari, R. (2007): Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. DARU Vol.15, (1).

Yili (2010): Isolation and characterization of antimicrobial resistant *Staphylococcus aureus* in retail ground meats. M.S. Thesis, University of Maryland.