



Çiğ Sütlerde Antibiyotik Kalıntı Analizlerinde Hızlı Test Metotlarının ve HPLC Tekniğinin Değerlendirilmesi

Emrah TORLAK^{1✉}, Mukadderat GÖKMEN², Ümit GÜRBÜZ³,
Bünyamin KIZTANIR⁴, Mehmet Kürşat IŞIK⁴

1. Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 42050, Konya
2. Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 10145, Balıkesir
3. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 42075, Konya
4. Gıda Kontrol Laboratuvarı, 42090, Konya

Özet: Bu çalışmada, farklı prensiplere dayalı üç farklı antibiyotik test kitinin performansları beta-laktam grubu antibiyotiklerden penisilin G, ampisilin, amoksisilin ve kloksasilin ile yapay olarak kontamine edilmiş çiğ süt örneklerinde değerlendirildi. Kontamine edilmemiş çiğ süt örneklerinde immunoreseptör ve enzimatik temelli test kitleri ile yanlış pozitif sonuç alınmadı. Bununla beraber, mikrobiyal inhibisyon temelli test kiti ile bir örnekten yanlış pozitif sonuç elde edildi. Türk Gıda Kodeksi maksimum kalıntı limitlerinde en yüksek hassasiyet oranı immunoreseptör temelli test kiti ile elde edildi. Enzimatik temelli test kitinin maksimum kalıntı limitlerindeki performansının yetersiz olduğu tespit edildi. Çalışmada, örnekteki antibiyotik kalıntılarının C₁₈ katı faz ekstraksiyonu, benzoik anhidrit ve 1,2,4-triazol civa klorid solüsyonu ile türevlendirme ve 325 nm dalga boyunda UV ile tespit prensibine dayanan HPLC metodu kullanıldı. Metot tespit limitleri, ampisilin için 8 µg/kg, amoksisilin için 8 µg/kg; penisilin G için 6 µg/kg ve kloksasilin için 11 µg/kg olarak belirlendi. Ortalama geri kazanımlar % 67.7 ve % 76.6 arasında tespit edildi. Kromatografik metot ile elde edilen tespit limitleri, ampisilin, amoksisilin ve penisilin G için Türkiye ve Avrupa Birliği maksimum kalıntı limitlerinin üzerinde saptandı.

Anahtar kelimeler: Beta-laktam, Çiğ süt, Hızlı test kiti, Likit kromatografi

Evaluation of Rapid Test Methods and HPLC for Antibiotic Residue Analysis in Raw Milk Samples

Abstract: In this study, the methodological performance of three antibiotic residue screening test kits based on different principles were evaluated in artificially contaminated raw milk samples with beta-lactams including ampicillin, amoxicillin, penicillin G and cloxacillin. No false positive result was obtained with immunoreceptor and enzymatic-based test kits in raw milk samples without artificial contamination. However, a false positive result was obtained from one sample using the microbial inhibition-based test kit. At maximum residue limits of Turkish Food Codex, the highest sensitivity rate was obtained from the immunoreceptor-based test kit. The performance of enzyme-based test kit at maximum residue limits was found as insufficient. HPLC method used herein was based on the C₁₈ solid phase extraction and ultraviolet detection at 325 nm of residues derivatized with benzoic anhydride and 1,2,4-triazole mercuric chloride solution. Detection limits of the method were 8, 8, 6 and 11 µg/kg for ampicillin, amoxicillin, penicillin G and cloxacillin, respectively. The mean recovery rates ranged from 67.7 % to 76.6 %. Limits of detection using chromatographic method were found as exceeding the Turkish and European MRLs for ampicillin, amoxicillin and penicillin G.

Key words: Beta-lactam, Raw milk, Screening test kit, Liquid chromatography

✉ Emrah Torlak

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 42050, Konya, e-posta: torlakemrah@yahoo.com

GİRİŞ

Antibiyotikler süt sığırcılığında özellikle mastitis tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Mitchell ve ark., 1998; Suhren ve Beukers, 1998). Hayvancılıkta en çok kullanılan antibiyotikler; beta-laktamlar, tetrasiklinler, aminoglikozitler, makrolidler ve sülfonamidlerdir (Mellenberger, 1997; Güley ve Akbulut, 2000). Çeşitli ülkelerde süt ve süt ürünlerindeki antibiyotik kalıntı problemi, aynı ülkede yetiştiricilerin konuya ilişkin eğitim düzeylerine, yasal düzenlemelere ve denetim etkinliklerine göre önemli derecede değişebilmektedir (Allison, 1985). Son yıllarda halk sağlığı ve gıda güvenliği konularında toplumda oluşan bilinç süt kalitesine olan ilgiyi arttırmıştır (Van Schaik ve ark., 2002). Süt kalitesinin belirlenmesinde; bakteri ve somatik hücre sayısı ile birlikte antibiyotikler başta olmak üzere kimyasal kalıntılar önemli kalite indikatörleri arasında yerini almıştır (Allison, 1985; Andrew ve ark., 1997).

Süt endüstrisinde antibiyotik kalıntı analizleri için kullanılan hızlı test kitlerinin kolay uygulanabilir, geniş spektrumda sonuç verebilen ve düşük maliyetli olmaları istenmektedir. Mikrobiyal inhibisyon temelli test kitleri bu özellikleri taşımalarının yanında uzun analiz süreleri dezavantaj oluşturmaktadır. Enzimatik ve immuno reseptör temelli kitler ise daha kısa analiz sürelerine sahiptir. Ancak mikrobiyal inhibisyon temelli kitlelere nazaran maliyetleri yüksektir. Bununla birlikte enzimatik ve immuno reseptör temelli kitlerin en büyük dezavantajları yalnızca belirli antibiyotik gruplarını tespit edebilmeleridir (Charm ve Zomer, 1995; Mitchell ve ark., 1998; Suhren ve Beukers, 1998).

Hızlı test kitlerinin etken maddeyi tanımlama edememeleri ve yüksek somatik hücre sayısına bağlı olarak yanlış pozitif sonuç risklerinin fazla olması çığ sütlerde antibiyotik kalıntı analizlerinde daha hassas ve spesifik tanımlama ve tayin metotlarını gerekli hale getirmiştir. Bu amaçla en yaygın kullanılan metotlar gaz ve likit kromatografisi metotlarıdır. Beta-laktam grubu antibiyotik kalıntılarının tespitini-

de ise likit kromatografi, gaz kromatografi ve jel elektroforez gibi teknikler arasında en yaygın kullanılan likit kromatografi tekniğidir (Van Eenennaam ve ark., 1993).

Bu çalışmada, beta-laktam grubu penisilinlere yönelik farklı prensipler ile çalışan hızlı test kitleri hassasiyet ve seçicilik oranları açısından birbirleri ile karşılaştırıldı ve yanlış pozitif sonuçlara çığ süt örneklerindeki toplam bakteri ve somatik hücre sayısının etkisi değerlendirildi. Çalışmada yapay olarak kontamine edilmiş örnekler ile HPLC tekniğinin metot performansı da değerlendirildi. Bu çalışma; süt endüstrisi ve kontrol laboratuvarlarına hızlı test kitlerinin seçimi konusunda katkı sağlamak ve HPLC tekniğinin metot performansı hakkında bilgi vermek amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada kullanılan çığ süt örnekleri Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü çiftliğindeki en az 30 gün süreyle antibiyotik tedavisi görmemiş ineklerden alındı. Steril cam kavanozlara yaklaşık 500 ml alınan süt örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara taşındı. Çığ süt örnekleri laboratuvarında analize alınmaya kadar 4°C'de muhafaza edildi.

Çalışmada farklı prensiplere dayalı üç farklı test kiti kullanıldı. Bu test kitlerin, üreticileri ve çalışma prensipleri Tablo 1'de verilmiştir.

Yapay Kontamine Örneklerin Oluşturulması:

Referans antibiyotik standartlarının saf su ile hazırlanan stok çözeltileri ile süt örnekleri yapay olarak kontamine edildi. Penisilin G (Sigma-Aldrich, P3032), ampisilin (Sigma-Aldrich, A9393) ve amoksisilin (Sigma-Aldrich, A8523) için kontaminasyon düzeyleri 2, 4, 8, 16 ve 32 µg/kg olarak, kloksasilin (Sigma-Aldrich, 28221) için kontaminas-

yon düzeyleri ise 15, 30, 45 ve 60 µg/kg olarak seçildi.

Toplam Bakteri Sayımı: Toplam bakteri sayımı FDA Bacteriological Analytical Manual (Anonim, 2001)'e göre yapıldı. Çiğ süt örneklerinden Maksimum Recovery Diluent (Oxoid, CM0733) ile hazırlanan seri dilüsyonlardan paralel olarak Plate Count Agar'a (Oxoid, CM0325) ekim yapıldı ve 30°C'de 48 saat inkübe edildi.

Somatik Hücre Sayımı: Somatik hücre sayımı 91/180 no'lu Avrupa Birliği direktifine (Anonim, 1991) göre Breed metodu ile gerçekleştirildi. Bu amaçla metilen mavisi (0.6 g, Merck, 115943), % 96'lık etil alkol (54 ml), 1,1,1- trikloreten (40 ml, Merck, 108749) ve glasiyal asetik asit (6 ml)'ten oluşan boya solüsyonu kullanıldı.

Test Kitlerinin Seçicilik ve Hassasiyetlerinin

Değerlendirilmesi: Kontamine edilmemiş süt örneklerinden elde edilen sonuçlar ile test kitlerinin seçicilikleri değerlendirildi. Hızlı test kitlerinin hassasiyetleri ise çalışmada kullanılan her etken madde için Türk Gıda Kodeksi'nde (TGK, 2002) verilen maksimum kalıntı limitlerini kapsayacak şekilde farklı düzeylerde kontamine edilmiş süt örneklerinden alınan sonuçlar ile değerlendirildi. Hızlı test kitleri ile çalışmalar üretici firmadan sağlanan prosedürlere göre yapıldı.

Kromatografik Analizler: Kromatografik analizler HPLC sistemi ile Avrupa Birliği Antibiyotik Kalıntı Referans Laboratuvarı tarafından yayınlanan metoda göre yapıldı (Anonim, 2000). Kromatografik analizler; ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyonu ile temizleme, türevlendirme ve HPLC sistemi ile 325 nm'de tanımlama ve miktar tayini olmak üzere dört aşamada gerçekleştirildi.

Ekstraksiyon: 5 ml süt örneği cam santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 30 ml 0.1 M fosfat buffer (pH 8) eklendi. Proteinlerin presipitasyonu için 2 N

sülfürik asitle pH 4.0-4.5'e ayarlandı. 2400 g ve 4°C'de 10 d santrifüj sonrasında sulu faz bir cam tüp içerisine alınarak proteinler uzaklaştırıldı ve 5 M sodyum hidroksit ile pH 7.8-8.3'e ayarlandı. 2400 g 4°C'de 10 d santrifüj sonrasında elde edilen sulu faz temizleme için kullanıldı.

Temizleme (Clean-up): Temizleme, ekstraksiyon aşaması sonucunda elde edilen sulu fazın sırasıyla 10 ml metanol, 10 ml ultra saf su, 5 ml % 2'lik sodyum klorür çözeltisi ve 5 ml 0.1 M fosfat buffer (pH 8) ile yıkanan C₁₈ katı faz ekstraksiyon kartuşundan (Waters, 186004619) vakum altında geçirilmesiyle yapıldı. Elüsyon 1 ml su/asetonitril (60/40, v:v) çözeltisinin kartuştan geçirilmesiyle ile tamamlandı.

Türevlendirme: Temizleme sonucu elde edilen elüata 50 µl 0.2 M benzoik anhidrit (Merck, 80131) eklenerek 50°C'de 5 d su banyosunda bekletildi. Türevlendirilmenin ikinci aşaması su banyosundan alınan elüatın 500 µl civa klorid (Merck, 104419) ve 1,2,4-triazole (Merck, 808388)'den oluşan türevlendirme çözeltisi ilavesi sonrası 65°C de su banyosunda 10 d bekletilmesi ile tamamlandı. Türevlendirilmiş elüat karanlıkta ve oda ısısında muhafaza edildi.

Kromatografik analiz şartları: Analizlerde Dionex (Sunnyvale, ABD), P680 pompa, ASI-100 otomatik enjeksiyon ünitesi, TCC-100 kolon fırını ve PDA-100 DAD dedektörden oluşan HPLC sistemi kullanıldı. Mobil faz olarak 0.1 M fosfat buffer/asetonitril/metanol (65:30:5, v:v:v) çözeltisi kullanıldı. Mobil fazın akış hızı 1.0 ml/d, örnek hacmi 200 µl ve seçilen kolon sıcaklığı 20°C olarak ayarlandı. Kromatografik ayırım C₈ kolon (150×3.9 mm; 5µm, Waters, WAT054235) ile gerçekleştirildi. Tanımlama ve miktar tayinleri 325 nm'de yapıldı.

Metot performansının değerlendirilmesi:

Linearite çalışması penisilin G, ampisilin ve amoksisilin için 4, 8, 16 ve 32 µg/kg konsantrasyon

aralığında, kloksasilin için 15, 30, 45 ve 60 µg/kg konsantrasyon aralığında yapıldı. Linearite çalışması için standart antibiyotik çözeltileri fosfat buffer /asetonitril (60:40, v:v) ile hazırlandı. Korelasyon katsayıları (R^2) 0.990 ile 0.993 arasında hesaplandı.

Her bir etken madde için yüzde geri kazanım değerleri ve tespit limiti (LOD) belirlenmiştir. LOD, sinyal/gürültü oranına (Signal to noise, S/N) göre saptandı. S/N değerinin 3 olduğu konsantrasyon LOD olarak değerlendirildi.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Çiğ sütte yüksek somatik hücre ve bakteri sayısı subklinik mastitisin bir göstergesidir (Van Eenennaam ve ark., 1993; Zvirdauskiene ve Salomskien, 2007). Mikrobiyal inhibisyon temelli test kitlerinde, sütlerde subklinik mastitis ile miktarları artan laktoferrin gibi doğal antibiyotiklerin yanlış pozitif sonuçlara neden olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (Van Eenennaam ve ark., 1993, Andrew ve ark., 1997; Kang ve Kondo 2001). Bu nedenle öncelikli olarak sonuçlar üzerine somatik hücre ve toplam bakteri sayısının etkisinin değerlendirilmesi için yapay

kontaminasyon için kullanılan 30 adet çiğ süt örneğinde somatik hücre ve toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı yapıldı. Süt örneklerinde somatik hücre sayısı ve toplam bakteri sayısı ile ilgili veriler Tablo 2’de gösterildi. Çiğ süt örneklerindeki ortalama somatik hücre sayısı ve ortalama toplam bakteri sayısı Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği’ne (TGK, 2000) göre yasal sınırların (Somatik hücre sayısı= 5.0×10^5 adet/ml, toplam bakteri sayısı= 1.0×10^5 kob/ml) üzerinde tespit edildi.

Kontamine edilmemiş çiğ süt örneklerinde immuno reseptör ve enzimatik temelli test kitleri ile yanlış pozitif sonuç saptanmadı. Bununla beraber mikrobiyal inhibisyon temelli test kiti ile bir örnekten yanlış pozitif sonuç tespit edildi. Mikrobiyal inhibisyon temelli test kiti ile yanlış pozitif sonuç saptanan örnekteki somatik hücre sayısı kritik limit olarak kabul edilen 8.0×10^5 adet/ml’den, toplam bakteri sayısı ise 1.0×10^6 kob/ml’den yüksek tespit edildi. Bu durum daha önce mikrobiyal inhibisyon temelli test kitleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ile paralellik arz etmektedir (Macaulay ve Packard 1981; Van Eenennaam ve ark., 1993, Andrew ve ark., 1997; Kang ve Kondo 2001).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan hızlı test kitleri, üreticileri ve çalışma prensipleri.

Table 1. Rapid test kits, their manufacturers and working principles used herein.

Test kiti	Üretici	Prensip
Charm CowSide [®]	Charm Sciences Inc., ABD	Mikrobiyal inhibisyon
Delvo Xpress [®]	DSM Food Specialtiest, Hollanda	İmmuno reseptör
Penzym [®]	UCB Bioproducts, Belçika	Enzimatik

Tablo 2. Çiğ süt örneklerinde tespit edilen somatik hücre ve toplam bakteri sayıları.

Table 2. Somatic cell and total bacteria counts in raw milk samples.

Parametre	En düşük	En yüksek	Ortalama
Somatik hücre sayısı (adet/ml)	2.8×10^5	1.2×10^6	7.3×10^5
Toplam bakteri sayısı (kob/ml)	1.5×10^5	1.4×10^6	6.6×10^5

Çalışmada değerlendirilen hızlı test metotları ile yapay kontamine edilmiş örneklerden belirlenen sonuçlar Tablo 3’de gösterildi. Bu sonuçlara göre test kitlerinin TGK maksimum kalıntı limitleri için hassasiyetleri yüzde pozitif oranı olarak Tablo 4’te

gösterildi. Bu sonuçlara göre amoksisilin, ampisilin, penisilin G ve kloksasilin için en yüksek hassasiyet oranı immuno reseptör temelli test kiti ile en düşük hassasiyet oranı ise enzimatik temelli test kiti ile elde edildi. İmmuno reseptör temelli test kitinin

hassasiyet oranı ampisilin ve penisilin G için %100 olarak saptandı. Enzimatik temelli test kiti ile amoksisilin ve kloksasilin maksimum kalıntı limitlerinde tespit edilemedi. İmmüno reseptör ve mikrobiyal inhibisyon temelli test kitlerinden elde edilen sonuçlar Popelka ve ark. (2004)'nın sonuçları ile uyum sağlamaktadır. Scanella ve ark. (1996) çiğ sütlerde immüno reseptör temelli test kiti ile

yaptıkları çalışmada penisilin G, ampisilin ve kloksasilin için benzer hassasiyet oranları tespit etmişlerdir.

Elde edilen sonuçlar; immüno reseptör temelli test kitinin metot performansının mikrobiyal inhibisyon ve enzimatik temelli kitlere nazaran daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 3. Hızlı test kitleri ile farklı kontaminasyon düzeyleri için elde edilen sonuçlar.

Table 3. Results of rapid test kits for different contamination levels.

		Konsantrasyon (µg/kg)			
		2	4	8	16
Amoksisilin	Mikrobiyal inhibisyon*	0/30	12/30	30/30	30/30
	İmmüno reseptör**	0/30	22/30	30/30	30/30
	Enzimatik***	0/30	0/30	18/20	30/30
Ampisilin	Mikrobiyal inhibisyon	0/30	20/30	30/30	30/30
	İmmüno reseptör	5/30	30/30	30/30	30/30
	Enzimatik	0/30	4/30	23/30	30/30
Penisilin G	Mikrobiyal inhibisyon	3/30	24/30	30/30	30/30
	İmmüno reseptör	11/30	30/30	30/30	30/30
	Enzimatik	0/20	1/30	21/30	30/30
		Konsantrasyon (µg/kg)			
		15	30	45	60
Kloksasilin	Mikrobiyal inhibisyon	0/30	10/30	18/20	30/30
	İmmüno reseptör	0/30	23/30	30/30	30/30
	Enzimatik	0/30	0/30	13/30	30/30

* Charm CowSide (Charm Science Inc., ABD), **Delvo Xpress (DSM Food Specialties, Hollanda) *** Penzyme (UCB Bioproducts, Belçika)

Tablo 4. Hızlı test kitlerinin maksimum kalıntı limitlerindeki hassasiyetleri.

Table 4. Sensitivity of rapid test kits at maximum residue limits (MRLs).

	Amoksisilin	Ampisilin	Penisilin G	Kloksasilin
MRL (µg/kg)	4	4	4	30
% pozitif oranları				
Mikrobiyal inhibisyon	40	67	80	33
İmmüno reseptör	73	100	100	77
Enzimatik	0	10	3	0

Tablo 5. HPLC metodu ile saptanan tespit limiti ve geri kazanım değerleri.

Table 5. Detection limits and recovery values of HPLC method.

	Tespit Limiti (µg/kg)	Geri Kazanım (%)*
Amoksisilin	8	72.4 ± 4.1
Ampisilin	8	76.6 ± 5.6
Penisilin G	6	74.1 ± 4.8
Kloksasilin	11	67.7 ± 7.2

* Amoksisilin, ampisilin ve penisilin G için 16 µg/kg, kloksasilin için 30 µg/kg kontaminasyon düzeyinde 5 tekrar sonucu ile belirlendi.

Ampisilin, amoksisilin, penisilin G ve kloksasilin için HPLC metodu ile geri kazanım değerleri sırasıyla %76.6, %72.4, %74.1 ve %67.7 olarak tespit edildi. (Tablo 5). Brito ve Junqueira (2006) çalışmalarında geri kazanım değerlerini ampisilin için %60 ile %104.9 arasında, penisilin G için %82.7 ve %109.2 arasında saptamışlardır. Popelka ve ark. (2004) geri kazanım değerlerini ampisilin, amoksisilin, penisilin G ve kloksasilin için sırasıyla %75, %75, %74 ve %71 olarak tespit etmişlerdir. Sorensen ve ark. (1997) 4 µg/kg - 45 µg/kg konsantrasyon aralığında geri kazanım değerlerini amoksisilin için %95 ile %99 arasında; ampisilin için %99 ile %101 arasında; penisilin G için %97 ile %100 arasında; kloksasilin için %94 ile %95 arasında tespit etmişlerdir. Elde edilen geri kazanım değerleri Brito ve Junqueira (2006) ve Popelka ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmalar ile uyum sağlarken Sorensen ve ark. (1997)'nin elde ettiği geri kazanım değerlerinden oldukça düşük kalmıştır. Bununla birlikte elde edilen geri kazanım değerleri antibiyotik kalıntılarının çalışılan konsantrasyon düzeyleri için kabul edilebilir sınırlar içindedir (Huber 1998).

HPLC metodunun LOD değerleri ampisilin, amoksisilin ve penisilin G için sırasıyla 8 µg/kg, 8 µg/kg ve 6 µg/kg olarak TKG maksimum kalıntı limitlerinin üzerinde saptandı. Kloksasilin için 11 µg/kg olarak saptanan tespit limiti TKG maksimum kalıntı limitinin altındadır. Farklı araştırmacılar bu çalışmada kullanılan ekstraksiyon ve temizleme aşamaları ve kromatografik şartlar için oldukça farklı tespit limiti değerleri bildirmişlerdir. Brito ve Junqueira (2006) ampisilin ve pensillin G için tespit limitlerini sırasıyla 4 µg/kg ve 5 µg/kg olarak saptamışlardır. Popelka ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada tespit limitlerini ampisilin, amoksisilin, penisilin G ve kloksasilin için sırasıyla 9 µg/kg, 10 µg/kg, 5 µg/kg ve 19 µg/kg olarak saptamışlardır. Sorensen ve ark. (1997) tespit limitlerini amoksisilin, ampisilin, penisilin G ve kloksasilin için sırasıyla 1.4 µg/kg, 1.5 µg/kg, 1.3 µg/kg ve 1.4 µg/kg olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen LOD

değerleri, HPLC tekniğinin çiğ sütlerde beta-laktam grubu antibiyotik kalıntılarının tespitinde yetersiz olabileceğini gösterdi. Bu nedenle HPLC tekniğinin kullanımında öncelikle metodun hassasiyeti göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

- Allison JRD., 1985. Antibiotic residues in milk. Br. J. Pharmacol., 141, 9-16.
- Andrew SM., Frobish A., Paape MJ., Maturin, LJ., 1997. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes, J. Dairy Sci., 80, 3050-3057.
- Anonim. 1991. Commission Decision 91/180 of 14 February 1991. Certain methods of quality analysis of raw milk and heat-treated milk and the principle provisions. *Official Journal of the European Communities* L 93, (13 April).
- Anonim. 2000. Determination of ampicillin residues in milk by high performance liquid chromatography. Community Reference Laboratory for Antibiotic Residues.
- Anonim. 2001. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, Chapter 3, Aerobic Plate Count.
- Brito, RB., Junqueira RG., 2006. Determination of Beta-lactam residues in milk by high performance liquid chromatography. Braz. Arch. Biol. Technol., 49, 41-46.
- Charm SE., Zomer E., 1995. The evolution and direction of rapid detection/identification of antimicrobial drug residues. In Symposium residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. Proceedings. Kiel, Germany, IDF, Brussels, Belgium, 224-233.
- Güley Z., Akbulut N., 2000. Antimikrobiyal maddeler ve süt teknolojisindeki önemi. 6. Süt ve süt ürünleri sempozyumu tebliğler kitabı. 254-265.
- Huber L., 1998. Validation of analytical methods: review and strategy. LC-GC Int. 96-105.

- Kang JH., Kondo F., 2001. Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the delvotest sp assay. *J. Food Protect.*, 64, 1211-1215.
- Macaulay DM., Packard VS., 1981. Evaluation of the methos used to detect antibiotic residues in milk. *J. Food Protect.*, 44, 696-698.
- Mellenberger RW., 1997. Antibiotic violations increase in Michigan, *Michigan Dairy Review*, 2.
- Mitchell JM., Griffiths MW., McEwen SA., McNab WB., Yee AJ., 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: Causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J. Food Protect.*, 61, 742-756.
- Popelka P., Nagy J., Marcincak S., Rozanska H., Sokol J., 2004. Comparison of sensitivity of various screening assays and liquid chromatography technique for penicillin residue detection in milk. *Bulletin Veterinary Insitute Pulawy*, 48, 273-276.
- Scanella D., Neaves P., Keedy K., Bell C., 1996. An evaluation of delvo x-pres test for beta-lactams in ex-farm raw milk. *Int. Dairy J.*, 7, 93-96.
- Sorensen LK., Rasmussen BM., Boison JO., Keng L., 1997. Simultaneous determination of six penicillins in cows' raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr. B*, 694, 383-391.
- Suhren G., Beukers R., 1998. Delvotest sp for detection of kloksasilin and sulfamethoxazole in milk: IDF interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, 81, 978-990.
- Türk Gıda Kodeksi (TGK), 2000. Çiğ süt ve ısıtılmış içme sütleri tebliği, Tarih: 14.02.2000-23964, Tebliğ No: 2000/6.
- Türk Gıda Kodeksi (TGK), 2002 Hayvansal kökenli gıdalarda veteriner ilaçları maksimum kalıntı limitleri tebliği, Ek 1, Tarih: 28.04.2002-24739, Tebliğ No: 2002/30.
- Van Eenennaam, AL., Cullor JS., Perani L, Gardner, Al., Smith WL., Dellinger J., Guterbock WM., Jensen L., 1993. Evaluation of milk antibiotic residue screening tests in cattle with naturally occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 76, 3041-3052.
- Van Schaik GM., Lotem YH., Schukken S., 2002. Milk quality in New York state. Trends in somatic cell counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State in 1999-2000. *J. Dairy Sci.*, 85, 782-789.
- Zvirauskiene R., Salomskien, J., 2007. An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk, *Food Control*, 18, 541-547.