



## Sütte Antibiyotik Kalıntılarının Belirlenmesinde Kullanılan Hızlı Test Kitleri ve Güvenilirlikleri

Zeynep ÖZDEMİR<sup>1\*</sup>, Bünyamin TRAŞ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Konya- TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
11.01.2018	05.04.2018	30.06.2018

### Öz

Antibakteriyal ilaçlar, veteriner klinikte en yaygın kullanılan ilaç grubudur. Bu ilaçlar çeşitli seviyelerde süte geçerler. Sütte kalıntı taranmasında kullanılan çok sayıda ticari kit mevcuttur. Bu kitler çalışma prensiplerine göre mikrobiyolojik, immunokimyasal ve biyosensörler olarak sınıflandırılır. Ticari test kitlerinde kolostrum ve mastitisli sütte doğal antibakteriyel maddelerin bulunması, mastitisli sütte yüksek somatik hücre sayısı ve pH, sütin yüksek oranda yağ, yağ asiti ve protein içermesi, sütteki deterjan ve dezenfektan kalıntıları, süt numunelerinin depolama ve saklama koşulları, mikrobiyolojik metotlarda inkübasyon süresi, sütte antiparaziter ilaç kalıntılarının bulunması, test sonuçlarının cihaz yerine görsel olarak yorumlanması gibi nedenlere bağlı olarak yanlış-pozitif sonuçlar alınabilmektedir. Antibakteriyellerin tanımlanması ve doğrulanmasında en güvenilir yöntem kromatografik metotlardır. Türkiye’de hayvansal gıdalarda antibiyotikler ve diğer kimyasallar “Kalıntı İzleme Programı” ile son 11 yıldır Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından sürdürülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibakteriyal, güvenilirlik, kalıntı, kit, süt

### Rapid Test Kits Used to Identify Antibiotic Residues in Milk and Their Reliability

#### Abstract

Antibacterial drugs are the most widely use drug group in the veterinary medicine. These drugs pass to the milk at various levels. There are many commercial kits available for screening residue in the milk. These kits can be classified as microbiological, immuno-chemical and biosensors according to the working principles. Commercial test kits can give false-positive results due to the following reasons; the presence of natural antibacterial substances in colostrum and mastitic milk, high somatic cell count and pH in mastitis, presence of high fat, fatty acid and protein in milk, detergent and disinfectant residues in milk, storage and preservative conditions of milk samples, duration of incubation in microbiological methods, presence of antiparasitic drug residues in milk, visual interpretation of test results instead of device. Chromatographic analyse methods are the most reliable method for identifying and validating residues of antibacterial. Antibiotics and other chemicals are screened in animal food by the Ministry of Food, Agriculture and Livestock in Turkey for last 11 years with "Residue Monitoring Program".

**Key Words:** Antibacterial, kit, milk, reliability, residue

## GİRİŞ

Sütte antibiyotik kalıntılarının bulunması insanlarda sağlık problemlerine (anaflaktik şok, duyarlı kişilerde alerjik reaksiyonlarda artış), dirençli mikroorganizma suşlarının gelişmesine ve fermente süt ürünlerinde starter kültürleri inhibe ederek kalite kaybına neden olur (1, 2).

Hayvansal ürünlerde ilaçlar için maksimum kalıntı limitleri belirlenmiştir. Gıdalarda, yasal olarak izin verilen ilaç miktarına maksimum kalıntı limiti (MRL) denir. MRL; kabul edilebilir günlük alım miktarında da belirtildiği gibi insanda herhangi bir

sağlık problemine neden olmayan ilaç ve metabolitin miktarını tanımlar.

Hayvansal gıdalarda ilaç kalıntısını belirlemeye yönelik birçok hassas ve duyarlı analitik yöntemler geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Analitik metotlar tarama ve doğrulama metotları olarak iki sınıfa ayrılabilir. Hayvansal gıdalarda antibakteriyel kalıntı belirlenmesinde kullanılan tarama metotları biyoanalitik metotlar olup, ilaçları bireysel ya da grup olarak belirli limitlerde belirleyen çoğunlukla yarı kantitatif metotlardır. İn situ ortamlarda gerçekleştirilen bu

metotlar çalışma prensiplerine göre mikrobiyolojik, immunokimyasal ve biyosensörler olarak sınıflandırılmaktadır.

### 1. Mikrobiyolojik Metotlar

Sütte antibiyotik kalıntılarının belirlenmesinde kullanılan ilk test mikrobiyal inhibitör testidir ve 1952 yılında geliştirilmiştir (3). Bu testlerde sıvı ya da katı ortam içerisinde *Geobacillus* (*Bacillus*) *stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* var. *mycoides* veya *Streptococcus thermophilus* gibi mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bu yöntem genelde bakterilerin asit oluşturma ve renk maddelerini indirgeme, agarlı besi yerlerinde çoğalma ve mikroskopik morfolojilerinde meydana gelen değişimlerin saptanması gibi esaslara dayanmaktadır (4). Renk maddelerinin indirgenmesi esasına dayanan testlerde metilen mavisi, resazurin, 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorit (TTC) ve brom kresol moru gibi renk maddeleri kullanılmaktadır. Çiğ ve ısıl işlem görmüş sütlerde antibiyotik kalıntılarının tespiti için mikrobiyal inhibisyon testinde genellikle *Bacillus stearothermophilus* kullanılır. Bunun nedeni inhibitör maddelere daha duyarlı olması ve yüksek sıcaklıklarda (64 °C) hızlı çoğalma kabiliyetidir (5).

Yöntemlerin uygulanmasında koşulların standardize edilmesi ve test öncesi süt örneklerine belirli sıcaklıkta ısıl işlem uygulanması gerekmektedir. Isıl işlem uygulanmasının amacı yanıtıcı pozitif sonuçların alınmasına neden olabilen, sütteki olası faj ya da sıcaklığa duyarlı diğer doğal inhibitör etkenleri ortadan kaldırmaktır (6).

Analiz edilen süt numunesi ya doğrudan agar yüzeyine ya da kâğıt disk üzerine uygulanır. İnkübasyon sırasında numune eğer inhibitör madde içeriyorsa redüksiyon veya total inhibisyon, içermiyorsa test mikroorganizmasında belirtilen değişiklikler gözlenmez. Antibiyotik yokluğunda mikroorganizma çoğalır ve görsel olarak opaklaşır, asit üretimi olduğunda ise renk değişimi meydana gelir. Antibiyotik veya başka bir inhibitör mevcudiyetinde test mikroorganizması inhibe olur ve renk değişimi meydana gelmez (3).

Mikrobiyolojik inhibitör temelli testlerin çok sayıda ticari preparatı (Delvotest, Charm Aim-96, Charm Farm Test, Copan Milk Test, *Bacillus stearothermophilus* Disk Difüzyon Analizi, Eclipse 100, Trifenil Tetrazolyum Klorit (TTC) Testi, The Brilliant Black Reduction (BRT AIM) Testi, Blue-Yellow II, CowSide Test) mevcuttur ve pratikte kullanılmaktadır. Bu testlerin avantajı çok geniş belirleme spektrumu, uygulanmasının basit ve ucuz olması, çok sayıda örneğin taranması için kullanılabilirliğidir (3). Kromotografik yöntemler ile karşılaştırıldığında diğer önemli bir avantajı, mikrobiyolojik testler antibakteriyel aktiviteye sahip herhangi bir antibiyotik veya metaboliti saptayabilirken, kromotografik yöntemler genellikle daha önce hedef olarak seçilen bileşiklere uygulanır. Bu nedenle sütte mevcut olan diğer herhangi bir antibakteriyel madde belirlenmemiş olur. Dezavantajları ise spesifik olarak antibiyotikleri belirleyemezler. Antibiyotikleri belirleme düzeyleri sınırlıdır. Uzun inkübasyon periyodu (2,5-3,5 saat) gerektirir. Çoğunlukla  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerden penisiline duyarlıdır. Sütte doğal antimikrobiyal ajanlar yüksek konsantrasyonlarda bulunursa yanlış-pozitif sonuç verebilir (7-9). Aynı zamanda sütte bulunabilecek temizlik maddeleri ve dezenfektanlar gibi inhibitör maddeler de yanıtıcı pozitif sonuçların alınmasına neden olur (10).

### 2. İmmunokimyasal Metotlar

İmmunokimyasal yöntemler yüksek spesifiklik ve duyarlılık, kullanım kolaylığıyla rutin çalışmalarda kullanılabilen yarı-kantitatif yöntemlerdir. Bu testler antijen ve antikor arasındaki spesifik reaksiyona dayanmaktadır. İmmunokimyasal metotlar, antibiyotik kalıntılarını belirlerken kullanılan tespit etiketine bağlı olarak sınıflandırılmaktadır. ELISA, floroinmunolojik test (FIA), zaman çözümülemeli floro

immün test (TRFIA) ve floresans polarizasyon immün test (FPIA) örnek olarak gösterilebilir (11).

İmmunokimyasal metotların avantajları kullanımlarının kolay olması, tek analiz için kit başına düşen örnek sayısının çok olması, sonuçların kısa zamanda elde edilmesi (2-2,5 saat), yüksek spesifiklik ve duyarlılığa sahip olmalarıdır. Diğer yandan maliyetlerinin sürekli artması, buzdolabında saklanabilme süresinin kısa olması (birkaç ay), yanlış-pozitif sonuç alınabilmesi ve her kalıntı için bir kitin kullanılma zorunluluğunun olması gibi dezavantajları vardır (12).

Dünyada yaygın olarak kullanılan immünokimyasal temelli ticari test kitlerine LacTek, Delvo-X-Press  $\beta$ -laktam II, SNAP  $\beta$ -L, Beta Screen, Charm I ve Charm II, Beta-Star, Charm MRL, Penzym Test, Parallax örnek olarak verilebilir (11).

### 3. Biyosensörler

Biyosensör; biyolojik sinyal algılayıcının seçicilik özelliği ile hedef analitin konsantrasyonuna bağlı olarak sinyal üreten transüderin kombinasyonundan oluşan bir cihazdır. Biyosensörler hızlı ve spesifiklerdir. İn situ uygulamalar esnasında manipülasyonlara izin verir. Bu avantajlarına rağmen biyosensörlerin pratikte kullanımını sınırlayan iki faktör vardır. İlki biyolojik sinyal algılayıcının, pH, sıcaklık, iyonik değer gibi çevresel faktörler ve molekülün yapısına bağlı olarak saat veya gün içerisinde duyarlılığındaki değişiklik, ikincisi ise biyosensörlerde kullanılan fizikokimyasal dönüştürücülerin boyutlarıdır. Pratikte kullanılan biyosensörlerdeki transüderler yaklaşık mm- $\mu$ m aralığındadır (13).

Biyosensörlerin avantajları kullanımlarının kolay olması, kısa sürede sonuç alınabilmesi, birden fazla kalıntıyı tek seferde analiz edebilmesi ve yüksek verimlilik (saat ve dizi başına 120 numune) sağlayan bir teknik olmasıdır. Yüksek maliyetli donanım/ekipman gerektirmesi ise dezavantajdır (12).

### 4. Mikrobiyolojik Metotlarda Yanlış-Pozitifliğin Nedenleri

Mikrobiyal inhibisyona dayanan testler, sütte doğal olarak bulunan bileşiklerin ya da kirletici maddelerin mevcudiyetinde yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir. Mikrobiyolojik metotların önemli bir dezavantajı inhibitör maddelerin kaynaklarını belirleyememesidir. Mikrobiyal inhibisyon testlerinde yanlış-pozitifliğe neden olan etkileşimler; sütün bileşimi (yağ, protein, doğal inhibitörler), sütün dondurulması, deterjanlar, dezenfektanlar, antiparaziter ilaçlar, numune alma ve test prosedürünü uygulama sırasındaki hatalar olarak sayılabilir (14).

Laktoperoksidaz, laktoferrin, lizozim gibi antibakteriyel maddeler; sütte, kolostrumda ve özellikle mastitisli sütte (15, 16) belirlenmiştir. Laktasyon boyunca inek sütünde laktoferrin ve lizozim konsantrasyonları düşüktür. Laktoferrin konsantrasyonu meme involüsyonu sürecinde artarken doğum öncesi tekrar azalır. Kolostrum ilk günlerde yüksek konsantrasyonda laktoferrin ve çok yüksek olmayan konsantrasyonlarda lizozim içerirken, mastitisli sütte lizozim ve laktoferrin konsantrasyonu artar. Bu antibakteriyel etkinliğe sahip endojen maddeler antibiyotik kalıntılarının belirlenmesinde kullanılan mikrobiyolojik testlerde yanlış-pozitif sonuçlara neden olmaktadır (17). Yapılan bir çalışmada laktoferrin ve lizozimin Delvotest P'de testinde kullanılan *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*'in üremesini baskıladığı ortaya konulmuştur. Laktoperoksidazın ise tarama testine etki etmediği belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada Delvotest P test sonuçları üzerine lizozim ve laktoferrinin sinerjistik inhibitör etkiye sahip olduğu da belirtilmektedir (18).

Somatik hücre sayısı (SHS) yüksek olan koyun sütleri BRT ve Delvotest ile taranmış ve yanlış-pozitiflikle somatik hücre sayısı arasında pozitif bir ilişki olduğu bulunmuştur (19). Beltrán ve ark (20) BRT MRL tarama testinin yüksek somatik hücre sayısından en az etkilenen kit olduğunu belirlemiştir.

lerdir. Koyun ve inek sütünde elde edilen sonuçların aksine Contreras ve ark (21) keçi sütünde kullanılan Charm BsDA, Delvotest P ve Delvotest SP testlerinin yüksek SHS'den etkilenmediğini belirlemiştir. Son yıllarda yapılan bir araştırmada da somatik hücre sayısı yüksek olan keçi sütlerinin yanlış-pozitifliğe neden olmadığı teyit edilmiştir (20).

Mastitisli sütte yangı sonucu süttün fiziksel özellikleri değişir; süt pH'sı 6,6'dan 7'nin üzerine çıkar. Bu pH artışı, bakterilerin üremesi sonucu asit oluşumuna dayanan mikrobiyolojik analizlerde yanlış-pozitif sonuçlara neden olabilir (17).

Süt bileşiminde yüksek oranda yağ ve protein varlığı antibiyotiklerin taranmasında kullanılan test metotlarını olumsuz yönde etkileyebilir (22). Hızlı test kitleri (Delvotest T gibi) ile oksitetrasiklin ve tetrasiklin taranırken süt bileşiminin etkili olduğu ortaya konulmuştur (23). Süt yağ oranının ve düşük protein içeriğinin bazı mikrobiyolojik testlerde yanlış-pozitif sonuçlara neden olabileceği ifade edilmektedir (24). Diğer bir araştırmada ise bireysel koyun sütlerine uygulanan mikrobiyolojik inhibisyon testlerinde yüksek seviyede pozitiflik gözlenmiş bu duruma süt bileşenlerinin anlamlı bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (20). Holstein ırkı düvelerin sütlerindeki immunoglobulin (Ig) konsantrasyonu, yağ ve protein oranları, mastitis patojenleri, kolostrum ve geçiş sütündeki somatik hücre sayısının tarama testleri üzerine etkisi araştırılmış; süt proteini ve immunoglobulin G1 (IgG1) konsantrasyonlarındaki yükseliş Charm Cowside, CITE Snap ve Penzyme testlerinde, yağ oranı ise CITE Snap testinde yanlış-pozitif sonuçlarla ilişkili bulunmuştur. Pozitif sonuçların oranı kolostrum için 0.16-0.88, geçiş sütü için 0.60-1.0 arasında değişmektedir. Geçiş sütünde sadece Delvotest SP ve Penzyme testlerinin kabul edilebilir doğruluk oranına sahip olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar sütte antibiyotik taranmasında yanlış-pozitiflik oranlarının azaltılması için doğum-

dan sonraki altıncı sağıma kadar tarama yapılmamasını tavsiye etmişlerdir (8).

Keçi ve koyun sütünde yüksek düzeyde bütirik ve kaprik asit bulunması, testlerde pozitif sonuçlara neden olabileceği ve koyun süt yağ asit konsantrasyonunun ise Delvotest ve BRT test kitlerinin sonuçlarını etkilemediği belirlenmiştir (19). Keçi sütünde miristoleik yağ asidinin (Myristicaceae bitki familyasının tohumlarından kaynaklanan) Delvotest SP-NT MCS ile yapılan tarama testlerinde pozitif sonuçlara neden olabileceği ifade edilmiştir (14). Miristoleik asidin, mikrobiyolojik testlerde yaygın kullanılan Gram (+) bir bakteri olan *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* üzerinde antibakteriyal etkisinin olduğu ortaya konmuştur (25).

İnek sütünde antibiyotik taranmasında kullanılan farklı testlerde sütteki deterjan ve dezenfektan varlığının etkisi araştırılmış ve sonuçta, amonyum grubu ürünlerin yüksek konsantrasyonlarının Delvotest ve TTC testinin sonuçlarını, sodyum hidroksit ve sodyum hipokloritin pratikte kullanılan dozlarının ise sadece TTC testinin sonuçlarını etkilediği tespit edilmiştir (26). Diğer yandan, üretici firmanın tavsiye ettiği doza eşit veya yüksek konsantrasyonlarda kullanılan alkali deterjanların farklı mikrobiyolojik testlerde yanlış-pozitifliğe neden olduğu, asit deterjanların ise farklı konsantrasyonlarda pozitif sonuca yol açmadığı ifade edilmektedir (27-29). Bazı küçük çiftliklerde süt tanklarının temizlenmesinde evlerde kullanıma uygun, bulaşık deterjan ve dezenfektanları kullanılmaktadır. Evlerde kullanılan temizlik ürünlerinin mikrobiyal inhibisyon testlerine etkisini değerlendirmek için keçi sütünde yapılan çalışma sonucunda, sodyum lauret sülfat ve etanol içeren ürünlerin daha fazla yanlış-pozitifliğe neden olduğu belirlenmiştir (14).

Süt numunelerinin depolama koşulları da mikrobiyolojik test sonuçlarını etkileyebilir. Borrás ve ark (30) süt örneklerini dondurmanın pozitiflik yüzdesini penisilin G, ampisilin ve sefaperazon için

azalttığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca, buzdolabı koşullarında süt numuneleri saklanırken psikrotrofik flora (*Pseudomonas spp*) gelişebildiği, bunlardan özellikle *Pseudomonas tolaasii* lipodepsipeptidaz üreterek *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* gibi test bakterilerinin aktivitesini engellediği ifade edilmektedir (31).

Süt numunelerinde koruyucuların kullanımı pozitif sonuçlarda artışa neden olabilir. Koyun sütünde koruyucu olarak kullanılan potasyum dikromatin tarama test bakterisi *Geobacillus stearothermophilus*'un gelişimini inhibe ettiği belirtilmektedir (32). Farklı bir araştırmada ise azidiol eklenen süt ile eklenmeyen sütün tarama testine etkisi araştırılmış, sonuçta azidiol eklenen süt koruyucu eklenmeyen süte oranla çok yüksek şüpheli sonuç vermiştir. Azidiol ile korunmuş süt örneklerinde yanlış-pozitifliği azaltmak için mikrobiyal inhibisyona dayanan testlerde inkübasyon süresinin uzatılması önerilmiştir (33).

Mikrobiyolojik tarama test sonuçları üzerine keçi sütündeki antiparaziter ilaçların (albendazol, klosantel, diklazuril, febendazol, levamizol, diazinon, ivermektin) etkisini belirlemek için yapılan bir araştırmada (14), Eclipse 100 testinin sadece yüksek konsantrasyonlarda antiparaziter ilaç varlığından etkilendiği bulunmuştur. Ayrıca BRT MRL testinin düşük ilaç konsantrasyonlarından etkilendiği, klosantel ve diazinonun düşük, levamizol ve ivermektinin ise yüksek konsantrasyonlarda test sonuçlarını etkilediği de gözlenmiştir (14).

Test sonuçlarının yorumlanmasında görsel değerlendirme yerine cihaz kullanımı %99 oranında mikrobiyal tarama testlerinin doğruluğunu artırır. Görsel okumada açık sarı ve mor renklerin değerlendirilmesinin kolay ancak ara renklerin değerlendirilmesinin zor olduğu belirtilmektedir (34).

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Tedavi amacıyla kullanılan antibakteriyal ilaçlar hayvansal gıdalarda kalıntılara sebep olarak insan sağlığını olumsuz yönde etkilemekte ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından oluşturulan “Kalıntı İzleme Programı” ile hayvansal gıdalarda antibakteriyal dahil diğer ilaç ve kimyasallar son 11 yıldır taranmaktadır.

Hayvansal gıdalarda kalıntı tesbiti için tarama ve doğrulama metotları kullanılmaktadır. Sütte kalıntı taranmasına yönelik çok sayıda ticari kit mevcuttur. Bu kitlerin sahada pratik kullanım ve hızlı sonuç vermesi gibi avantajları yanında, spesifik olmama, yanlış pozitif/negatif sonuç verme gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

Konuyla ilgili çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde, testlerle ilgili farklı duyarlılık ve tutarsız sonuçların olduğu tespit edildi. Yanlış-pozitifliğin sebepleri incelendiğinde, test kitinin çalışma prensibi ve uygulayıcıya, hayvan türüne, çevreye (bitki florası gibi) ait faktörlerin öne çıktığı anlaşılmaktadır. Bu nedenle ticari kitlerin her zaman güvenilir sonuç verdiğini belirtmek uygun değildir. Sütlerde antibiyotik varlığının tanımlanması ve doğrulanmasında en güvenilir yöntemin kromatografik analiz metotları olduğu anlaşılmaktadır. Fakat kromatografik metotlardaki analizlerin uzun süreli olması, yüksek ekipman maliyeti ve tecrübeli personele ihtiyaç duyulması sahada pratik olarak uygulanmasına engel oluşturmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Bogialli S, Capitolo V, Curini R et al. (2004). Simple and Rapid Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Confirmatory Assay for Determining Amoxicillin and Ampicillin in Bovine Tissues and Milk. *J Agr Food Chem.* 52(11): 3286-3291.
2. Grunwald L, Petz M. (2003). Food Processing Effects on Residues: Penicillins in Milk and Yoghurt. *Anal Chim Acta.* 483(1-2): 73-79.



3. Mitchell J, Griffiths M, McEwen S et al. (1998). Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance. *J Food Protect.* 61(6): 742-756.
4. Bishop J, White C. (1984). Antibiotic Residue Detection in Milk-A Review. *J Food Protect.* 47(8): 647-652.
5. Katz SE, Siewierski M. (1995). *Bacillus stearothermophilus* Disc Assay: A Review. *J AOAC Int.* 78(6): 1408-1415.
6. Harrigan WF, McCance ME. (1976). *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology.* Academic Press Inc. (London) Ltd., London, UK.
7. Carlsson Å, Björck L, Persson K. (1989). Lactoferrin and Lysozyme in Milk during Acute Mastitis and Their Inhibitory Effect in Delvotest P. *J Dairy Sci.* 72(12): 3166-3175.
8. Andrew S. (2001). Effect of Composition of Colostrum and Transition Milk from Holstein Heifers on Specificity Rates of Antibiotic Residue Tests. *J Dairy Sci.* 84(1): 100-106.
9. Kang J, Jin J, Kondo F. (2005). False-Positive Outcome and Drug Residue in Milk Samples over Withdrawal Times. *J Dairy Sci.* 88(3): 908-913.
10. Schiffmann A, Schütz M, Wiesner H-U. (1992). False Negative and Positive Results in Testing for Inhibitory Substances in Milk. II: Factors Influencing the Brilliant Black Reduction Test (BRT). *Milchwissenschaft.* 47:770-772.
11. Kantiani L, Farré M, Barceló D. (2009). Analytical Methodologies for the Detection of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Milk and Feed Samples. *Trac-Trend Anal Chem.* 28(6):729-744.
12. Toldrá F, Reig M. (2006). Methods for Rapid Detection of Chemical and Veterinary Drug Residues in Animal Foods. *Trends Food Sci Tech.* 17(9):482-489.
13. Mungroo NA, Neethirajan S. (2014). Biosensors for the Detection of Antibiotics in Poultry Industry - A Review. *Biosensors.* 4(4): 472-493.
14. Rueda TR. (2015). Evaluation of False Positive Results in Microbial Inhibitor Tests for Screening Antibiotics in Goat Milk. PhD thesis. Universitat Politècnica de València. Departamento de Ciencia Animal – Departament de Ciència Animal, p. 32, Valencia.
15. Wolin A, Kosikowski F. (1958). Formation of Bacterial Inhibitory Zones in Whey Agar by Raw Milk. *J Dairy Sci.* 41(1): 34-40.
16. Kosikowski F, O'Leary M. (1963). Natural Inhibitory Characteristics of Some Irish Manufacturing Milks. *J Dairy Sci.* 46(2): 89-94.
17. Egan J, Meaney W. (1984). The Inhibitory Effect of Mastitic Milk and Colostrum on Test Methods Used for Antibiotic Detection. *J Food Sci Tech.* 8(2): 115-120.
18. Carlsson A, Björck L. (1987). The Effect of Some Indigenous Antibacterial Factors in Milk on the Growth of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. *Milchwissenschaft.* 42(5): 282-285.
19. Althaus R, Torres A, Peris C et al. (2003). Accuracy of BRT and Delvotest Microbial Inhibition Tests as Affected by Composition of Ewe's Milk. *J Food Protect.* 66(3): 473-478.
20. Beltrán M, Berruga M, Molina A et al. (2015). Performance of Current Microbial Tests for Screening Antibiotics in Sheep and Goat Milk. *Int Dairy J.* 41: 13-15.
21. Contreras A, Paape M, Di Carlo A et al. (1997). Evaluation of Selected Antibiotic Residue Screening Tests for Milk from Individual Goats. *J Dairy Sci.* 80(11): 1113-1118.
22. Andrew S. (2000). Effect of Fat and Protein Content of Milk from Individual Cows on the Specificity Rates of Antibiotic Residue Screening Tests. *J Dairy Sci.* 83(12): 2992-2997.
23. Comunian R, Paba A, Daga E et al. (2011). Evaluation of a Microbial Indicator Test for Antibiotic Detection in Ewe, Goat and Cow Milk. *IDF International Symposium on Sheep, Goat and Other non-Cow Milk*, 16-18 May, Athens-Greece.
24. Reybroeck W, Ooghe S. (2012). FASFC Acceptance Criteria for Microbiological Inhibitor Tests: Fulfillment by New Tests. *Proceedings of the EuroResidue VII Conference*, 14-16 May, Egmond aan Zee-The Netherlands.
25. Feldlaufer M, Knox D, Lusby W et al. (1993). Antimicrobial Activity of Fatty Acids against *Bacillus* larvae, the Causative Agent of American Foulbrood. *Apidologie.* 24(2): 95-99.
26. Merin U, Rosenthal I, Bernstein S et al. (1985). The Effect of Residues of Detergents and Detergents-Sanitizers on the Performance of Antibiotic Test and the Organoleptic Quality of Milk. *Le Lait.* 65(649-650): 163-167.
27. Žvirdauskienė R, Šalomskienė J. (2007). An Evaluation of Different Microbial and Rapid Tests for Determining Inhibitors in Milk. *Food Control.* 18(5): 541-547.
28. Salomskiene J, Macioniene I, Zvirdauskiene R et al. (2013). Impact of the Residues of Detergents and Disinfectants Used in Dairy Farms on the Results of Inhibitor Tests for Raw Milk. *Adv Biosci Biotechnol.* 4: 266-272.
29. Beltrán MC, Romero T, Nagel OG et al. (2011). Effect of Detergent Residues in Goat's Milk on the Response of Screening Methods for Antibiotic Detection. *IDF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk*, 16-18 May, Athens-Greece.
30. Borrás M, Berruga MI, Molina A et al. (2011). Effect of Freezing Sheep's Milk on Microbiological Methods to Detect Antibiotics. *IDF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk*, 16-18 May, Athens-Greece.

31. Reybroeck W, De Vleeschouwer M, Marchand S et al. (2014). Cyclic Lipodepsipeptides Produced by *Pseudomonas* spp. Naturally Present in Raw Milk Induce Inhibitory Effects on Microbiological Inhibitor Assays for Antibiotic Residue Screening. *PLoS one*. 9(5): e98266.
32. Molina M, Althaus R, Balasch S et al. (2003). Evaluation of Screening Test for Detection of Antimicrobial Residues in Ewe Milk. *J Dairy Sci*. 86(6): 1947-1952.
33. Montero A, Althaus R, Molina A et al. (2005). Detection of Antimicrobial Agents by a Specific Microbiological Method (Eclipse100®) for Ewe Milk. *Small Ruminant Res*. 57(2-3): 229-237.
34. Stead S, Ashwin H, Richmond S et al. (2008). Evaluation and Validation According to International Standards of the Delvotest® SP-NT Screening Assay for Antimicrobial Drugs in Milk. *Int Dairy J*. 18(1): 3-11.

**Yazışma Adresi:**

\* Zeynep ÖZDEMİR  
Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye.  
e-posta: zynp.ozdmr@windowslive.com  
Telefon: 0332 223 26 73  
Fax: 0332 241 00 63  
GSM: 0553 328 48 76