

Kvalitativno određivanje rezidua antibiotika u mleku različitim skrining metodama i bio testom

Jelena Petrović,^{1*} Ksenija Čobanović,² Mira Kovačević,¹ Radomir Ratajac¹

¹Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, Rumenački put 20, Novi Sad

²Novosadska mlekara, Sentandrejski put 9, Novi Sad

Kratak sadržaj

Rezidue veterinarskih lekova u mleku predstavljaju rizik za zdravlje konzumenta. Da bi se ispunili zakonski propisi i smanjili ekonomski gubici u mlekarama se vrši testiranje mleka na prisustvo antibiotika na samom prijemu pre nego što se mleko prikupi u tankove. Jedan od bitnih zahteva mlekara je i vreme trajanja ispitivanja, zato su brojni proizvođači ponudili brze skrining testove, stoga je cilj rada je da se primenom različitih skrining metoda i Bio testa uporedno ispita prisustvo rezidua antibiotika u sirovom mleku uzorkovanom na prijemu u mlekari. Skrining testovi osetljivi samo prema β -laktamskim antibioticima (Delvo-X-press, Penzim S, Beta Star i CHARM β -laktam test) su pokazali odličnu podudarnost. Bio test i Delvo SP test imaju nešto slabiju podudarnost sa ostalim testovima. Na osnovu izvršenih ispitivanja može se zaključiti da postoji potreba za uvođenjem skrining testova koji su osetljivi i prema drugim antimikrobnim lekovima osim β -laktamskih antibiotika. Jedan od novih komercijalnih testova je Twinsensor (Unisensor S.A., Belgija) koji je osetljiv ne samo prema β -laktamskim antibioticima već i prema tetraciklinima.

Ključne reči: mleko, rezidue, skrining, antibiotici

* e-mail: jelena@niv.ns.ac.yu

Qualitative determination of antibiotic residues in milk with different screening methods and bio test

Jelena Petrović¹, Ksenija Čobanović², Mira Kovačević¹, Radomir Ratajac¹

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

²Novi Sad Dairy, Sentandrejski put 9, Novi Sad

Abstract

Veterinary drug residues in milk represent a health risk for the consumer. To comply with national drug residue regulations and to minimize economic losses, milk testing for antibiotics at the truck site, before pumping the contents into the silo, is applied in dairy industry. Because of the time requirements for microbiological inhibition tests, several companies offer more rapid commercial tests. The aim of this study was to compare different screening methods and Bio test in examination of raw milk at truck site in dairy. The results showed that assays sensitive only to β -lactams (Delvo-X-press, Penzim S, Beta Star and CHARM- β L test) have good agreement. Bio test and Delvo SP test have less agreement with other tests. The results also show that introduction of rapid tests for the detection of more antibiotic groups is necessary, e.g. Twinsensor (Unisensor S.A., Belgium) which enables to detect β -lactam and tetracycline antibiotics as well.

Keywords: milk, residue, screening, antibiotics

UVOD

Prvi skrining testovi za ispitivanje rezidua veterinarskih lekova u namirnicama su razvijeni za detekciju β -laktamskih antibiotika u mleku (Mitchell i sar.,1998). Kontrola prisustva rezidua antibiotika u mlekari je obimna i svakodnevna. Proizvođači testova su na zahteve mlekara odgovorili velikom ponudom različitih testova, tako da se danas na tržištu mogu naći testovi koji daju rezultate za samo 5-10 minuta (Petrović i Katić, 2003).

Skrining testovi za pregled mleka se, na osnovu principa rada dele na: mikrobiološke inhibitorne, enzimске, receptor vezujuće, enzimске kolorimetrijske i imunološke (Mitchell i sar.,1998; Navratilova, 2008).

Bio test nije komercijalni test, već predstavlja jednostavnu probu kojom se potvrđuje da li se od ispitivanog mleka upotrebom starter kulture može napraviti jogurt tj. dostići odgovarajuća kiselost i nekada se dosta koristio u našim mlekarama.

Ovaj test pokazuje određene nedostatak, kao što su dužina trajanja ispitivanja i nedovoljna osetljivost u odnosu na MDK vrednosti (Katla i sar., 2001), stoga se danas više ne koristi mlekarima ali može dati podatke o tome šta se dešava sa ispitivanim mlekom u postupku proizvodnje jogurta. MDK vrednost je maksimalno dozvoljena koncentracija rezidua u hrani, odnosno maksimalna koncentracija rezidua koja se smatra bezbednom za konzumenta (Codex alimentarius, 1993).

Delvo test SP je mikrobiološka inhibitorna metoda sa *Geobacillus* (*Bacillus*) *stearothermophilus* var. *calidolactis*: C 953 kao test mikroorganizmom. Princip rada testa se zasniva na sprečavanju rasta test mikroorganizama u prisustvu rezidua antibiotika, što se manifestuje izostankom promene boje podloge posle propisane inkubacije. Delvo SP test je osetljiv ne samo prema β -laktamskim već i prema drugim antibioticima (tetraciklini, aminoglikozidi, makrolidi itd.), ali i sulfonamidima. Vreme izvođenja testa je 3 h (Suhren i Beukers, 1998).

Penzim test je kvalitativna enzimska metoda za brzo dokazivanje β -laktamskih antibiotika u mleku (25 min). U ovom testu se kao glavni reagens koristi enzim DD-karboksipeptidaza (penicilin vezujući protein) koji se vezuje za rezidue β -laktamskih antibiotika iz uzorka, reakcija postaje vidljiva dodavanjem reagens tablete koja sadrži substrat D-alanin, a čijim razlaganjem nastaje promena boje indikatora (Mitchell i sar., 1998; Gustavsson i Sternesjö, 2004).

DELVO-X-Press test za β -laktamske antibiotike u mleku je kvalitativni enzimski, receptor vezujući test. Princip rada se zasniva na vezivanju konjugovanog enzima za rezidue antibiotika iz mleka. Ako u uzorku nije bilo rezidua, konjugat enzima ostaje slobodan i vezuje se za antibiotike koji su imobilisani na zidu test epruvete. Nakon ispiranja i dodavanja substrata za enzim dolazi do razvijanja boje. Očitavanje se vrši pomoću instrumentalne jedinice koja automatski interpretira rezultate. Vreme izvođenja testa je 6 min (Angelidis i sar., 1999; Petrović i Katić, 2001).

Beta Star test je kvalitativni receptor vezujući test koji sadrži specifičan receptor za β -laktamske antibiotike vezan za čestice zlata. Receptori se vezuju za rezidue antibiotika iz mleka (ako ih ima), zatim se u test bočicu postavlja tračica sa imuno-hromatografskom podlogom. Ukoliko u uzorku nisu prisutni β -laktamski antibiotici, biomolekuli na prvom delu imuno-hromatografske podloge imobilisu ukupne receptore, što se manifestuje pojavom ružičaste trake. Ukoliko u mleku ima rezidua na prvom delu podloge receptori će ostati slobodni, odnosno pojava ružičaste boje će izostati. Vreme izvođenja testa je 5 minuta (Navratilova, 2008).

CHARM test je takođe receptor vezujući test. Princip rada se zasniva na vezivanju funkcionalne grupe antibiotika za enzim koji se nalazi na ili u mikrobnj ćeliji. Mikroorganizam, koji ima receptore za vezivanje antimikrobnog leka, dodaje se ispitujućem uzorku, zatim se dodaje obeleženi antibiotik (npr. C-14 penicilin) da bi se takmičio sa eventualno prisutnom reziduom antibiotika za receptorsko mesto; metoda je i semi kvantitativna, jer što se više penicilina C-14 veže manje je antibiotika u uzorku. Postoji više vrsta CHARM testa namenjenih za različite uzorke kao i različite vrste antibiotika. U našim ispitivanjima je korišćen test CHARM- β L namenjen za

otkrivanje prisustva β -laktamskih antibiotika u mleku. CHARM test se može koristiti i ispitivanju rezidua HPLC metodom, gde identifikuje frakciju aktivnog leka (Navratilova, 2008).

U našoj zemlji danas je dostupan veliki broj različitih skrining testova stoga je cilj rada da se primenom različitih skrining metoda i Bio testa uporedno ispita prisustvo rezidua antibiotika u sirovom mleku uzorkovanom na prijemu u mlekari.

MATERIJAL I METODE

Materijal: sirovo mleko je uzorkovano iz transportnih cisterni na prijemu mleka u mlekari. Ukupno je ispitano 100 uzoraka. Prisustvo prirodnih inhibitornih materija (lizocim, laktoferin, laktoperoksidaza) je eliminisano inaktivacijom mleka na 95°C tokom 10 min, obzirom da prirodne inhibitorne materije mogu dovesti do pojave lažno pozitivnih nalaza na mikrobiološkim inhibitornim testovima (Kang i sar., 2005).

Metode: Bio test je izvođen tako što je 100 ml mleka inaktivisano a nakon toga je ohlađeno na 42°C, zatim je dodata 2% jogurtna kultura (*Str. termophilus*, *Lb. bulgaricus*). Dalje je izvršena inkubacija u trajanju od 2 sata i određen stepen kiselosti. Stepenn kiselosti manji ili jednak 25°SH smatran je pozitivnim rezultatom. Delvo SP test, Delvo-X-press β -laktam II test (DSM, Holandija), Beta Star test (Chr. Hansen, Danska), CHARM MRLTM β -laktam test (Charm science, inc, USA) i Penzim S test (UCB-Bioproducs S.A., Belgija) su izvođeni prema uputstvu proizvođača.

Statističke metode: Kappa test vrednost je izračunata na osnovu postupka koji je preporučio Valčić (1998). Ova metoda statističke analize se koristi za proveru usaglašenosti (podudarnost nalaza) ili neusaglašenosti rezultata dva testa. Kappa može imati vrednosti: 0,81 idealna podudarnost, 0,61-0,80 skoro idealna podudarnost, 0,41-0,60 prilična podudarnost, 0,21-0,40 srednja podudarnost, 0,00-0,20 beznačajna podudarnost i 0,00 nema podudarnosti.

REZULTATI I DISKUSIJA

Prvi skrining testovi za ispitivanje rezidua lekova u namirnicama su razvijeni za mlekarSKU industriju, odnosno za detekciju β -laktamskih antibiotika u sirovom mleku (Mitchell i sar.,1998). Beta laktamski antibiotici se široko koriste u terapiji i profilaksi oboljenja mlečnih goveda i to prvenstveno kod mastitisa. Stoga nije neobično da ova grupa antibiotika predstavlja najčešću vrstu rezidua koja se može naći u mleku (Fischer i sar., 2003). Zbog prisustva rezidua antibiotika u mleku najpre je nastao problem u proizvodnji sireva i jogurta, jer se zbog inhibicije mlekarSKih kultura fermentacija nije mogla odvijati na pravilan način, samim tim nije mogao nastati gotov proizvod, što je dovođilo do ekonomskih gubitaka. Starter kulture, uključujući i onu koja se koristi u Bio testu, pokazuju veliku osetljivost prema β -laktamskim antibioticima dok je osetljivost prema ostalim grupama antimikrobnih lekova daleko manja (tabela 1).

Masovna upotreba antibiotika u prethodnim decenijama dovela je do proučavanja niza neželjenih efekata i uobličavanja problematike rezidua u odvojenu oblast. Posebno mesto u ovoj oblasti zauzimaju metode za pregled i selekciju velikog broja uzoraka – skrining metoda zajedno sa zakonskom regulativom o maksimalno dozvoljenoj količini rezidua.

Tabela 1: Osetljivost bakterija mlečne kiseline prema antimikrobnim lekovima (Katla i sar., 2001)

Antimikrobni lek	Minimalna inhibitorna koncentracija (µg/l)			
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
penicilin	0,002-0,047	0,002-3	0,016-2	0,002-0,125
streptomycin	2-256	0,5-64	0,094-24	0,047-24
hloramfenikol	0,5-6	1-64	1-8	0,125-6
tetraciklin	0,19-2	0,064-8	0,38-6	0,016-1,5
sulfadiazin	256	256	256	256
gentamicin	2-192	0,064-4	0,016-2	0,125-16
trimetoprim	32	32	32	32

Osnovni kriterijumi za izbor skrining metode u mlekari su senzitivnost i specifičnost ali i brzina dobijanja rezultata. Senzitivnost, kao najvažniji parametar, je određena mogućnošću testa da detektuje količinu rezidua u nivou maksimalno dozvoljene količina rezidua (MDK). MDK vrednosti za Evropsku Uniju su propisane u Council Regulation 2377/90 i kreću se u različitom rasponu od zabrane prisustva (zero tolerance) za hloramfenikol, preko malih količina 4 ppb za neke β-laktamske antibiotike u mleku do raspona od 200 i više za aminoglikozide itd. Brojni komercijalni skrining testovi ispunjavaju zahteve vezane za senzitivnost (tabela 2).

Tabela 2: Prag detekcije različitih testova (Althaus i sar., 2003; Petrović i sar., 2008; Council Regulation 2377/90) (ND- ne detektuje (nije osetljiv))

Antimikrobni lek	Prag detekcije (µg/l)					MDK (µg/l)
	<i>Delvo SP</i>	<i>Delvo X press</i>	<i>Beta star</i>	<i>PenzimS</i>	<i>CHARM-βL</i>	
penicilin	2,5	2	2	4	2	4
ampicilin	2	3	2	2	4	4
amoksisicilin	2	4	2	3	2	4
kloksacilin	30	35	5	30	15	30
streptomycin	2500	ND	ND	ND	ND	200
tilozin	50	ND	ND	ND	ND	50
tetraciklin	100	ND	ND	ND	ND	100
sulfadiazin	50	ND	ND	ND	ND	100
gentamicin	100	ND	ND	ND	ND	100
neomicin	100	ND	ND	ND	ND	500

S obzirom da je u našoj zemlji dostupan veliki broj različitih skrining testova prvo pitanje koje se nameće je kakva je podudarnost rezultata pri ispitivanju istih uzoraka mleka. Kao važan kriterijum pri poređenju rezultata uzeti su i rezultati paralelnog ispitivanja Bio testom, zbog velike osetljivosti starter kulture prema β -laktamskim, ali i postojanja osetljivosti i prema drugim antimikrobnim lekovima. Rezultati ispitivanja 100 uzoraka sirovog mleka Bio testom, Delvo SP testom, Delvo-X-press testom, Penzim S testom i Beta Star testom su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3: Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka sirovog mleka različitim testovima

Biotest		Rezultati ispitivanja skrining testova			
SH°	Br. uzor	Svi testovi pozitivni	Svi testovi negativni	Delvo SP pozit / ostali negat	Delvo X negat / ostali pozit
≤10	9	8	0	1	0
11-20	14	4	2	7	1
21-25	4	0	2	1	1
ukupno	27	12	4	9	2
26-30	23	1	17	4	1
≥ 31	50	0	46	3	1
ukupno	73	1	63	7	2

U uzorcima mleka u kojim se razvila jaka inhibicija starter kulture i dovela do razvijanja vrlo slabog kiselinskog stepena (= 10SH°), ustanovljeno je da je najčešći uzrok ovakve inhibicije prisustvo β -laktamskih antibiotika (88,89% uzoraka) i to verovatno u većim količinama, dok je nešto ređe (11,11%) uzrok ovako jake inhibicije prisustvo drugih antimikrobnih lekova. Jogurtna kultura je veoma osetljiva prema β -laktamskim antibioticima (tabela 1). Ova grupa antibiotika se najčešće koriste u terapiji mastitisa, a samim tim su i najčešća vrsta rezidua u sirovom mleku. Zbog toga je u ovim uzorcima i vrlo nizak kiselinski stepen, a Penzim S test, Beta Star i Delvo X press test su potvrdili prisustvo β -laktamskih anitibiotika. Podudarnost Bio testa sa ostalim testovima je od 88,88 do 100 % rezultata. Ovako velika podudarnost je nastala zbog visoke količine rezidua koja se lako može dokazati različitim testovima zato što ne dolazi do nepodudarnosti testova usled različite osetljivosti.

Do nešto slabije inhibicije starter kulture (kiselinskog stepena 11-20°SH i kiselinski stepen 21-25°SH, dovode β -laktamski antibiotici (33,33%), verovatno u nešto manjim koncentracijama nego u prethodnoj grupi, a zatim i ostali antimikrobni lekovi (44,44%). U manjem broju uzoraka (22,22%) uzročnici nepoznate etiologije su doveli do inhibicije starter kulture. Može se pretpostaviti da je moguć uticaj bakteriofaga na starter kulturu ali ne mogu se isključiti i drugi faktori npr. uslovi inkubacije i dr. Delvo X press test se pokazao slabije osetljiv prema β -laktamskim antibioticima u odnosu na ostale testove, s obzirom da je kod dva

uzorka imao negativan rezultat iako su drugi testovi pokazali prisustvo ovih antibiotika.

Značajniju grupu predstavljaju uzorci u kojima je ustanovljeno prisustvo rezidua koje nisu imale nikakav uticaj na starter kulturu (tabela 3). Od 73 ispitana uzorka kod 4,10% je ustanovljeno prisustvo β -laktamskih antibiotika a kod 9,59% uzoraka drugih antimikrobnih lekova. Od ovakvog mleka je moguće napraviti jogurt, ali tako dobijen proizvod nije bezbedan za ishranu ljudi.

Rezultati ispitivanja 25 uzoraka sirovog mleka Bio testom, Delvo SP test, Delvo-X-press testom, Penzim S testom, Beta Star testom i CHARM- β L testom su prikazani u tabeli 4. CHARM- β L test ima u potpunosti podudarne rezultate sa testovima koji su osetljivi samo prema β -laktamskim antibioticima identične rezultate Penzim S testom i sa Delvo X press testom. Razlike u rezultatima su ustanovljene jedino kod Delvo SP testa a nastale su kao posledica prisustva rezidua drugih antibiotika ili sulfonamida.

Tabela 4: Rezultati ispitivanja 25 uzoraka sirovog mleka Bio testom, Delvo SP test, Delvo-X-press testom, Penzim S testom, Beta Star testom i CHARM- β L testom

Biostat		Rezultati ispitivanja skrining testova		
SH°	Br. uzor	Svi testovi pozitivni	Svi testovi negativni	Delvo SP pozit/ostali negat
≤ 10	8	8	0	0
11-25	7	3	3	1
≥ 26	10	0	10	0
ukupno	25	11	13	1

Statistički obrađena podudarnost testova ukazuje na dobru međusobnu podudarnost koja se kretala u intervalu od prilične do idealne podudarnosti (tabela 5). Najbolja međusobna podudarnost – idealna podudarnost - je ustanovljena između testova koji su osetljivi samo prema β -laktamskim antibioticima Delvo-X-press, Penzim S, Beta Star i CHARM- β L test. Nešto slabija podudarnost (skoro idealna i prilična podudarnost) je ustanovljena poređenjem DelvoSP i Bio testa sa ostalim testovima. Nešto slabija podudarnost je posledica razlike u senzitivnosti, DelvoSP je osetljiv i prema ostalim antimikrobnim lekovima, a Bio test ima nešto viši prag detekcije u odnosu na ostale testove (tabele 1 i 2). Do sličnih podataka su došli i drugi autori (Andrew i sar., 1997; Gibbons-Burgener i sar., 2001; Petrović i sar., 2008).

Tabela 5: Kappa podudarnost

Test	Međusobna podudarnost testova				
	Bio test	Delvo SP	Delvo X	Penzim	Beta star
CHARM-βL	0,69**	0,92**	1,00***	1,00***	1,00***
Beta star	0,54*	0,59*	0,84***	1,00***	
Penzim	0,54*	0,59*	0,84***		
Delvo X	0,51*	0,46*			
Delvo SP	0,67**				

*** idealna podudarnost, ** skoro idealna podudarnost * prilična podudarnost,

ZAKLJUČAK

Kontrola mleka je neophodna s obzirom na činjenicu da su rezidue veterinarskih lekova utvrđene u 33% ispitanih uzoraka. Najčešća vrsta rezidua u mleku su β-laktamski antibiotici (45,95% pozitivnih rezultata) ali je značajno i prisustvo rezidua drugih antimikrobnih lekova (43,97% pozitivnih rezultata). Takođe u jednom broju uzoraka mleka je skrining testiranjem ustanovljeno odsustvo rezidua ali ipak od ovakvog mleka nije bilo moguće napraviti jogurt (10,81% pozitivnih rezultata). Izvršenim ispitivanjima je otkriven i jedan broj uzoraka mleka, rizičnog po zdravlje ljudi zbog prisustva rezidua, od kog je moguće napraviti jogurt (13,70%).

Skrining testovu osetljivi samo prema β-laktamskim antibioticima (Delvo-X-press, Penzim S, Beta Star i CHARM-βL test) su pokazali odličnu podudarnost. Bio test i Delvo SP test imaju nešto slabiju podudarnost sa ostalim testovima. Na osnovu izvršenih ispitivanja može se zaključiti da postoji potreba za uvođenjem skrining testova koji su osetljivi i prema drugim antimikrobnim lekovima osim β-laktamskih antibiotika. Jedan od novih komercijalnih testova je Twinsensor (Unisensor S.A., Belgija) koji je osetljiv ne samo prema β-laktamskim antibioticima već i prema tetraciklinima.

LITERATURA

1. Althaus R.L., Torres A., Montero A., Balash S., Molina M.P.: Detection limits of antimicrobials in ewe milk by delvotest photometric measurements. *J Dairy Sci*, 86,457–463, 2003.
2. Andrew SM., Frobish RA., Paape M.J.: 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, 11, 3050-7,1997.
3. Angelidis A.S., Farver B.T., Cullor J.S.: Evaluation of the Delvo-X-Press assay for detecting antibiotic residues in milk samples from individual cows. *J Food Prot*, 62, 1183–1190, 1999.
4. Codex alimentarius, vol. three, Residue of veterinary drugs in foods. Food and agriculture organisation of united nations, Rome: WHO. 1993.

5. Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, L 224, 18.8.1990.
6. Fischer W.J., Tritscher A.M., Schilter B., Stadler R.H.: Contaminants resulting from agricultural and dairy practices. In: Roginski H.: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 1, 516–525, 2003.
7. Gibbons-Burgener S., Kaneene J., Lloyd J., Leykam J., Erskine R.: Reliability of three bulk-tank antimicrobial residue detection assays used to test individual milk samples from cows with mild clinical mastitis. *American J. Of Vet. Res* 62, 11, 1716-1720, 2001.
8. Gustavsson E., Sternesjö Č.: Biosensor analysis of α -lactams in milk: comparison with microbiological, immunological, and receptor-based screening methods. *J AOAC Int*, 87, 614–620, 2004.
9. Kang J.H., Kondo F.: Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the Delvotest SP assay. *J Food Prot*, 64, 1211–1215, 2001.
10. Katla AK, Kruse H, Johnsen G., Herikstad H. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int J Food Microb*, 67, 1-2, 147-152, 2001.
11. Mitchell JM, Griffiths MW, Mcewen SA, McNab WB, Yee AJ,. Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance. *J Food Prot*, 61, 6, 742-756, 1998.
12. Pavlína Navrátilová. Screening Methods Used for the Detection of Veterinary Drug Residues in Raw Cow Milk – A Review. *Czech J. Food Sci*, 26, 6, 393–401, 2008.
13. Petrović J., Katić V.: Receptor enzimska metoda - Delvo-x-press betalaktam-II test - u detekciji rezidua beta laktamskih antibiotika u mleku. *Mlekarstvo*, 4, 30-34, 2001.
14. Petrović J., Katić V.: Uporedno ispitivanje rezidua antibiotika u mleku enzimskom i mikrobiološkim metodama. *Veterinarski glasnik*, 57, 1-2, 43-49, 2003.
15. Petrović J., Katić V.: Comparative Examination of the Analysis of β -Lactam Antibiotic Residues in Milk by Enzyme, Receptor-Enzyme, and Inhibition Procedures. *Food Anal. Methods* (2008) 1:119–125 DOI 10.1007/s12161-007-9007-y.
16. Suhren G, Beukers R.: Delvotest SP for detection of cloxacillin and sulfamethoxazole on milk: IDF interlaboratory study. *J AOAC Int*, 81, 5, 987-90, 1998.
17. Valčić M. *Opšta epizootiologija*. Beogradu: Fakultet veterinarske medicine, 1998.
Primljeno: 02.02.2009.
Odobreno: 03.03.2009.