

# RESIDUI DI ANTIBIOTICI SULLE COLTURE LATTICHE DEL SIERO INNESTO E NEL FORMAGGIO

**I residui di antibiotici possono interferire con la crescita e le attività delle flore lattiche del siero innesto impiegato per la produzione di formaggi. Ecco gli effetti di 9 categorie di antibiotici comunemente utilizzati presenti nel latte**

di **VALENTINA GAMBA**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Chimica degli Alimenti e Mangimi, Brescia

**GIUSEPPE BOLZONI**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Centro di referenza nazionale per la qualità del latte bovino, Brescia

**PAOLA MONASTERO,  
MARINA NADIA LOSIO**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Reparto Controllo Alimenti, Brescia

**PAOLO DAMINELLI**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Centro di referenza nazionale per i rischi emergenti in sicurezza alimentare, Milano

**L**a produzione di formaggi duri e semi-duri a partire dal latte crudo, richiede l'utilizzo di siero innesto naturale, rappresentato da un complessa miscela di flore lattiche (lattobacilli e lattococchi).

Il latte destinato a caseificazione può contenere residui di antibiotici che possono interferire con la crescita e le attività delle flore lattiche del siero innesto impiegato. Lo studio analizza gli effetti dei residui di 9 categorie di antibiotici comunemente utilizzati, presenti nel latte a livelli pari ai Limiti massimi residuali (Lmr) stabiliti dalla legislazione europea. Attraverso la valutazione della curva di sopravvivenza di flore lattiche mesofile e lo studio dei profili di pH ed acidità Sh del siero innesto utilizzato, è stato dimostrato che Penicillina G, Cefquinome, Ceftiofur e il suo principale metabolita Desfuroylceftiofur hanno avuto un effetto inibente, mentre molecole quali Sulfadimetossina, Enrofloxacin, Ossitetraciclina, Amoxicillina e Monensin sono risultate prive di effetti inibenti evidenti.

Lo studio ha poi valutato la persistenza del Cefquinome nel formaggio semi-molle, ottenuto da latte precedentemente contaminato ad una concentrazione pari a 2 volte il Lmr: oltre il 90% dell'antibiotico rimane nel siero di lavorazione, mentre la concentrazione nella cagliata, inizialmente simile a quella di partenza del latte, decresce rapidamente nel formaggio durante la prima settimana di stagionatura, attestandosi al disotto del limite di rilevabilità del metodo dopo 3 settimane di stagionatura. Sono stati poi valutati gli effetti della presenza di residui di Ceftiofur sulla struttura di un formaggio semi-molle a concentrazioni pari al Lmr e a 0,5 X Lmr. In entrambi gli studi, il formaggio prodotto con latte contaminato da residui di antibiotici ha mostrato evidenti alterazioni della tessitura, costituite da crepe e occhiature, che suggeriscono un possibile effetto di inibizione dei residui di antibiotici nei confronti delle flore lattiche naturalmente presenti nel siero innesto di lavorazione e una possibile



È stato dimostrato che Penicillina G, Cefquinome, Cefotiofur e il suo principale metabolita Desfuroylcefotiofur hanno avuto un effetto inibente, mentre molecole quali Sulfadimetossina, Enrofloxacin, Ossitetraciclina, Amoxicillina e Monensin sono risultate prive di effetti inibenti evidenti.

proliferazione di specie batteriche non-starter. Inoltre, i dati implicano che i residui di antibiotici ai livelli consentiti possono ancora porre problemi tecnologici all'industria lattiero-casearia.

#### **INTRODUZIONE**

L'influenza della presenza di residui di farmaci e antibiotici nel latte destinato alla caseificazione è nota e ben documentata scientificamente; in particolare, la bibliografia

internazionale ha sempre evidenziato come diverse molecole siano in grado di inibire la capacità di crescita ed influenzare le dinamiche di comportamento dei microrganismi nelle diverse produzioni casearie, siano esse formaggi o derivati (1,2,3).

Tuttavia, la maggior parte dei lavori scientifici pubblicati negli anni, è stata eseguita con concentrazioni di antibiotico che erano ben al di sopra degli attuali limiti massimi residuali previsti dal Reg. (Ue) N. 37/2010

Nella foto, le fasi iniziali della lavorazione in caldaia nel caseificio

**TABELLA 1. Riferimenti bibliografici, matrici, principio attivo studiato e livello di contaminazione relativo agli studi dell'influenza di antibiotici sulle proprietà delle flore lattiche**

Bradfield et al., 1952, J. Dairy Science	Cheddar Cheese	Chlortetracycline	2.5x MRL
Whitehead and Lane, 1956, J. Dairy Research	Cheddar Cheese	Penicillin	7.5 - 75x MRL
Meanwell, 1962, J. Appl. Bact	Cheese Starter	Penicillin	7.5 - 15x MRL
Nikolov, 1966, Dairy Sci. Abstracts	Yoghurt Microflora	Penicillin Oxytetracycline Streptomycin	2.5 - 7.5x MRL 1 - 3x MRL 25x MRL
Cogan, 1972, Applied Microbiology	Cheese and Yoghurt Starter Bacteria	Penicillin Cloxacillin Streptomycin Tetracycline	22 x MRL 8x MRL 1.75x MRL 0.9x MRL
Anifantakis, 1980, Le Lait	Feta Cheese	Penicillin Chlortetracycline Oxytetracycline	30x MRL 100x MRL 100x MRL

del 22/12/2009, come rappresentato dagli esempi in **Tabella 1**.

A tali livelli il latte non può essere utilizzato per nessun motivo in quanto la presenza di residui di farmaci oltre il Lmr è considerato un rischio per la salute del consumatore finale. Gli Lmr, quindi, sono riconosciuti come parametri di tutela igienico-sanitaria, il cui superamento comporta l'eliminazione del latte dal circuito della trasformazione in alimenti destinati al consumo umano.

Le produzioni a Denominazione di origine protetta (Dop) come il Grana Padano, fondano la loro peculiarità sul doveroso rispetto della normativa comunitaria ed internazionale in ambito di sicurezza alimentare e richiamano all'interno del disciplinare di Produzione il riferimento a parametri specifici e rigorosi relativamente alle modalità di alimentazione del bestiame, al benessere animale, ponendo particolare attenzione all'origine delle materie prime vincolate al territorio di origine della Dop.

In seguito al verificarsi di alcune alterazioni nella struttura del prodotto (**Figura 1**) che si manifestano solitamente dopo circa 6-7 mesi di stagionatura, l'Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Izsler), nell'ambito delle attività previste dal Progetto di Ricerca Corrente Prc2013002, ha collaborato con alcuni caseifici al fine di definire la possibile origine del problema tenuto conto che il latte era conforme in quanto

sottoposto a programmi di autocontrollo e ai controlli ufficiali per quanto riguarda il Piano Nazionale Residui e che il formaggio risultava perfettamente idoneo al consumo nel rispetto di tutti i requisiti igienico-sanitari.

L'aspetto sul quale si è voluta concentrare l'attenzione, è rappresentato dalla possibile influenza di residui di farmaci ed antibiotici presenti al disotto degli Lmr nel latte destinato alla caseificazione, alla luce del complesso processo produttivo del Grana Padano Dop, che prevede, tra i passaggi più critici, la fase di affioramento del latte crudo e l'utilizzo di siero innesto derivante dalla lavorazione del giorno precedente quale fonte di flore lattiche ottenute dopo una complessa e delicata fermentazione. Particolare attenzione è stata dedicata alle dinamiche di comportamento ed alle influenze esercitate dagli antibiotici cosiddetti a "tempo sospensione zero" e a tempo di sospensione di 1 giorno.

## MATERIALI E METODI

L'Izsler, in collaborazione con due caseifici appartenenti al Consorzio di Produzione del Grana Padano Dop, ha monitorato la dinamica di comportamento di 9 categorie di antibiotici comunemente utilizzati per la terapia delle mastiti, presenti nel latte a livelli pari agli Lmr stabiliti dalla legislazione europea; successivamente ha monitorato i parametri qualitativi e microbiologici del siero innesto e del formaggio ottenuto da latte addizionato con livelli pari o inferiori agli Lmr, attraverso la valutazione della curva di sopravvivenza di flore lattiche mesofile e lo studio dei profili di pH ed acidità titolabile ° Sh del siero innesto utilizzato.

Lo studio ha infine valutato, a livello sperimentale, la persistenza di Cefquinome in un formaggio semi-molle, ottenuto da latte precedentemente contaminato ad un dosaggio pari a 2 volte il Lmr (40 µg/kg) e ha valutato la difettosità di un formaggio semi-molle ottenuto da latte precedentemente contaminato con Cefiofur ad un dosaggio pari al Lmr e a 0,5 x Lmr (100 µg/kg e 50 µg/kg).

Tutte le attività di contaminazione, analisi e valutazione del siero innesto e del formaggio sono state svolte presso la sede di Brescia dell'Izsler, nei laboratori del reparto Produzione Primaria, reparto Controllo alimenti e reparto Chimica degli alimenti e mangimi; la ricerca dei residui è stata effettuata mediante

**FIGURA 1. Difettosità presenti in forma di Grana Padano durante la stagionatura**





screening con metodo microbiologico con indicatore tramite Kit commerciale Delvo test SP Nt, Dsm seguito da conferma mediante la tecnica Lc-Ms/Ms.

### **1. Persistenza di residui di antibiotici nel latte durante l'affioramento**

Tale attività ha previsto la contaminazione di latte crudo con 34 molecole appartenenti a 5 categorie di antibiotici comunemente utilizzati (Beta-lattamici, Macrolidi, Chinolonici, Sulfamidici, Tetracicline e Ionofori); il latte addizionato ha subito un naturale processo di affioramento a +4°C per 6 ore, al termine del quale è stata definita la percentuale di antibiotico nel latte scremato e, per differenza, nella panna.

### **2. Effetto degli antibiotici sulla flora lattica naturale del siero innesto di caseificazione**

La prova ha previsto l'impiego di antibiotici Beta-lattamici tradizionali (Penicillina G e Amoxicillina), antibiotici Beta-lattamici con "tempo di sospensione zero" (Ceftiofur ed il suo principale metabolita Desfuroylceftiofur), antibiotici Beta-lattamici con tempo di sospensione di 1 giorno (Cefquinome), Sulfamidici (Sulfadimetossina), Chinolonici (Enrofloxacin), Tetracicline (Ossitetraciclina) e ionofori (Monensin); gli antibiotici sono stati addizionati al siero innesto normalmente impiegato durante la caseificazione del latte a Grana Padano Dop ad una concentrazione pari al Lmr considerato dai regolamenti comunitari per il latte crudo, valutando il profilo di pH, acidità Sh°50 e concentrazione di flore lattiche durante il normale processo di fermentazione applicato da due caseifici che hanno collaborato alla prova.

Il controllo della cagliata in caldaia da parte di un operatore



Il momento dell'estrazione della cagliata dalla caldaia che andrà poi tagliata per formare le due forme "gemelle"

### 3. Effetto degli antibiotici durante la caseificazione

#### a. Effetti sul siero innesto durante la lavorazione

Presso il minicaseificio sperimentale del Laboratorio Supporto alle Produzioni del Reparto Controllo Alimenti Izslar è stata simulata una lavorazione a Grana Padano ripercorrendo 3 giorni di lavorazione, contaminando il latte del giorno 1 con Desfuroylceftiofur ad una concentrazione pari all'Lmr (100 µg/kg) e quindi impiegando per le 2 lavorazioni successive il siero innesto ottenuto da latte addizionato sul quale sono state seguite analisi per la valutazione del profilo di pH, Acidità Sh<sup>50</sup>, concentrazione delle flore lattiche; anche la cagliata ottenuta dalle 3 lavora-

zioni è stata analizzata per definire il livello di concentrazione delle flore lattiche.

#### b. Effetti e persistenza nel prodotto finito

Il minicaseificio sperimentale è stato utilizzato anche per valutare la persistenza del residuo di antibiotico in un formaggio semi-molle, partendo da latte crudo precedentemente contaminato con Cefquinome alla concentrazione pari a 2 x Lmr (40 µg/kg) e per valutare l'effetto sulla struttura del prodotto durante la stagionatura di un formaggio semi-molle contaminato con Cefotiofur a due differenti concentrazioni (Lmr e 0,5 x Lmr rispettivamente pari a 100 µg/kg e 50 µg/kg).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### 1. Persistenza di residui di antibiotici nel latte durante l'affioramento

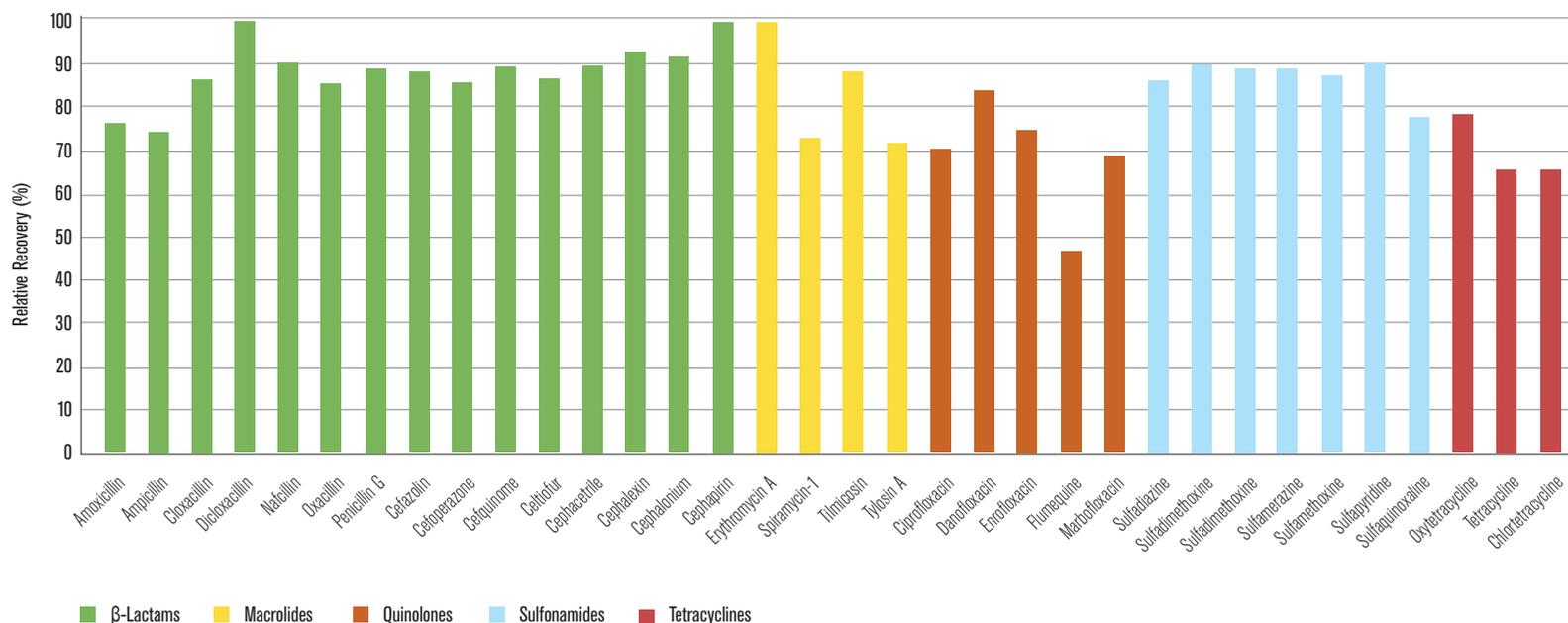
In **figura 2** è riportato il risultato relativo alla percentuale di recupero degli antibiotici nel latte dopo affioramento (6 ore a +4°C) artificialmente addizionati al latte crudo intero.

I risultati ottenuti confermano quanto precedentemente riportato dalla letteratura internazionale, relativamente al fatto che l'affioramento (naturale o indotto) del latte crudo intero non consente o consente in minima parte di ridurre la concentrazione per la maggior parte di residui di antibiotici o farmaci nel latte scremato. Tale risultato preliminare conferma che l'eventuale presenza di residui di antibiotico nel latte crudo intero si trasferisce in misura consistente nel latte destinato alla successive fasi di trasformazione, consentendo di definire un appropriato livello di contaminazione sperimentale, oggetto della seconda fase dell'attività di ricerca.

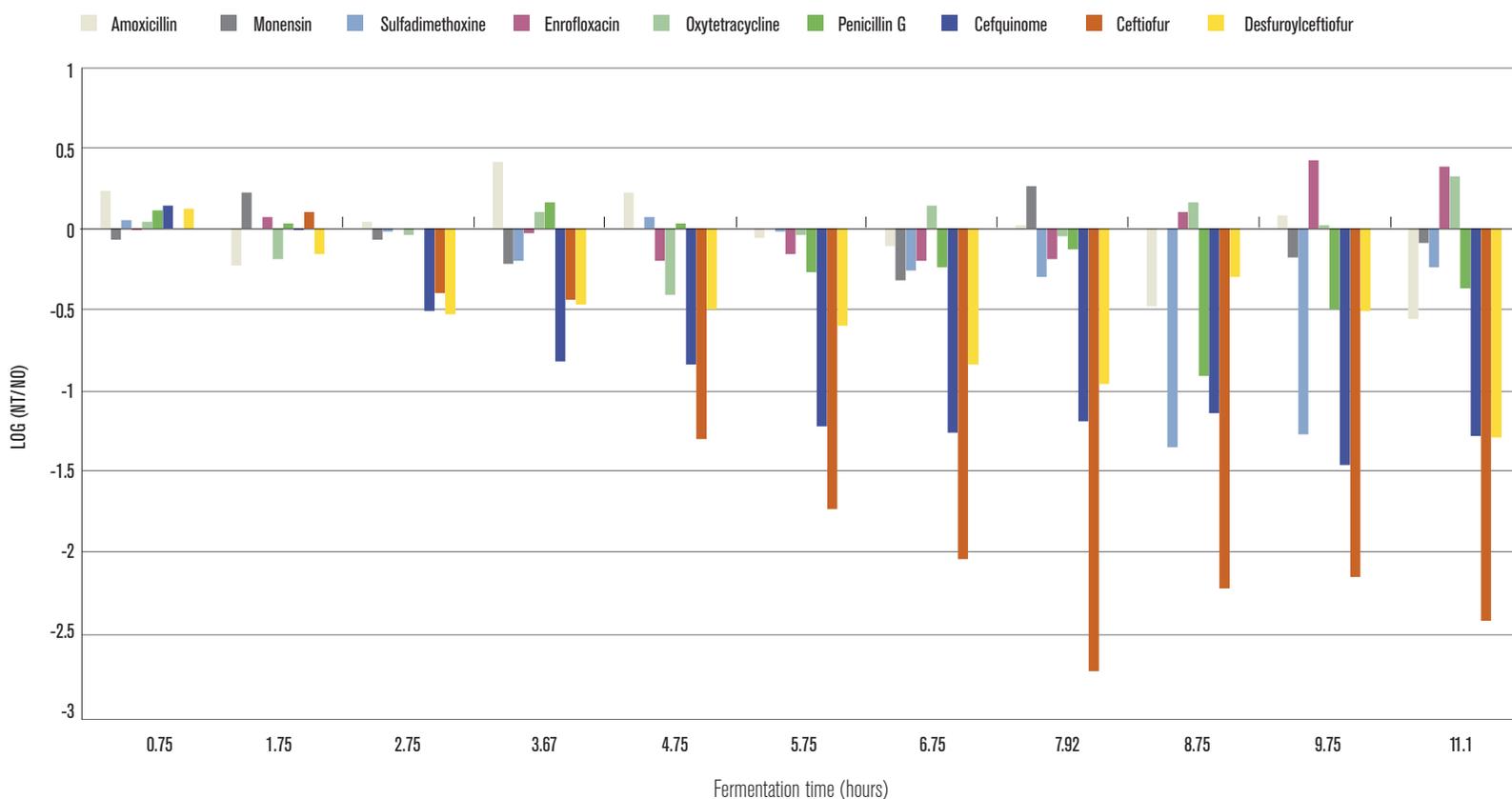
### 2. Effetto degli antibiotici sulla flora lattica naturale del siero innesto di caseificazione

In **figura 3** è riportato il livello di inibizione nei confronti della flora lattica, prodotto dalle diverse molecole addizionate al siero innesto prima della fermentazione e destinato all'impiego nella caseificazione del latte a Grana Padano; il siero innesto, precedentemente analizzato per definire l'assenza delle molecole successivamente addizionate,

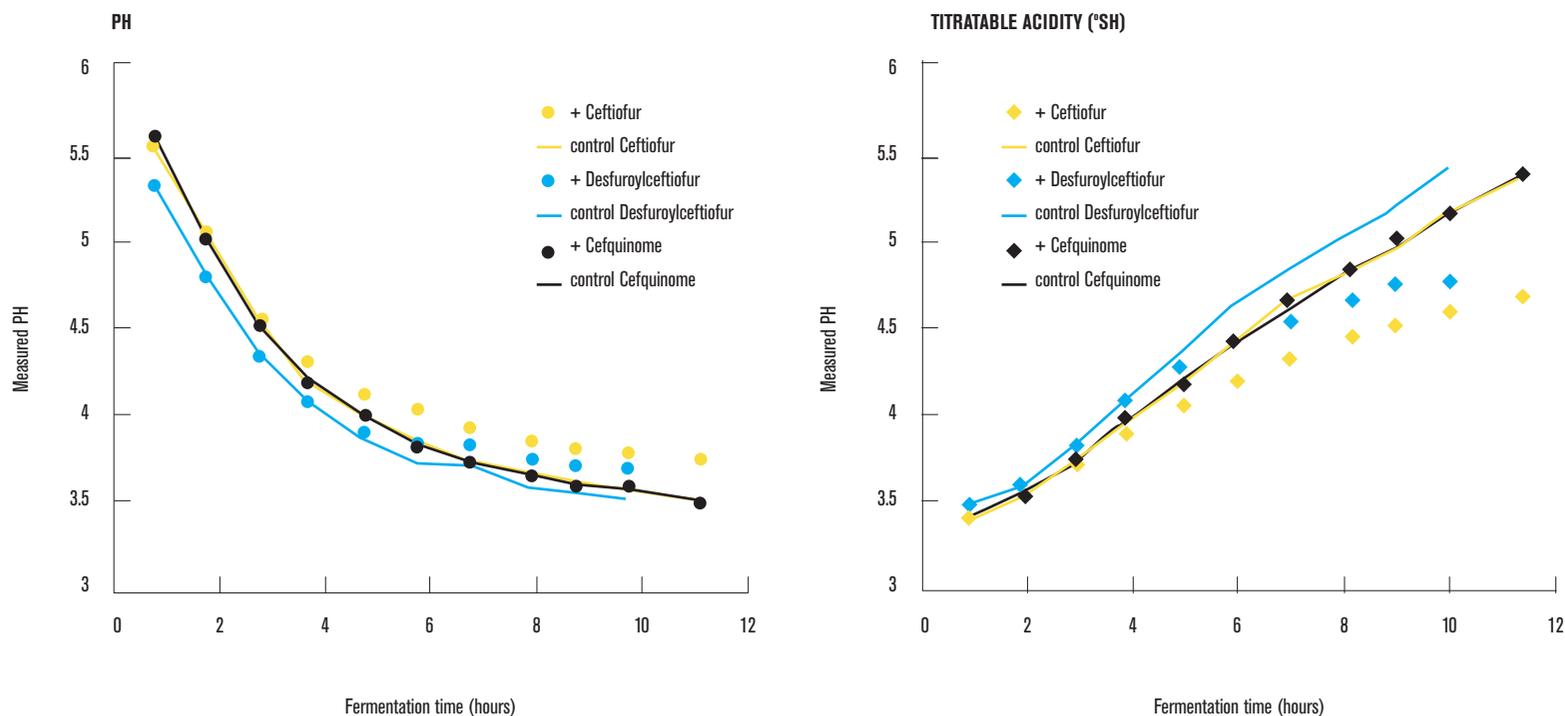
**FIGURA 2. Percentuale di recupero degli antibiotici nel latte dopo affioramento (6 ore a +4°C) artificialmente addizionati al latte crudo intero**  
(Figura tratta dal Poster presentato a The 30<sup>th</sup> World Buiatrics Congress 2018 Sapporo, Japan)



**FIGURA 3. Inibizione dei lattobacilli mesofili durante la fermentazione del siero innesto destinato alla caseificazione**  
(Tratto dal Poster presentato a The 30<sup>th</sup> World Buiatrics Congress 2018 Sapporo, Japan)



**FIGURA 4. Profilo di acidificazione del siero innesto contaminato durante la fermentazione (in ore) attraverso l'andamento del pH (sx) e dell'sh°50 (dx)**  
(Tratto dal Poster presentato a The 30<sup>th</sup> World Buiatrics Congress 2018 Sapporo, Japan)



è stato ottenuto da siero impiegato quotidianamente presso un caseificio del Consorzio di Produzione del Grana Padano Dop e fermentato in laboratorio applicando le stesse curve tempo/temperatura normalmente ottenute dal caseificio.

Il grafico riporta:

- in ordinata (Asse Y o asse verticale) la variazione logaritmica (Unità formanti colonia / ml di siero) in aumento (+) o in diminuzione (-) rispetto ad un siero di controllo considerando il rapporto tra la concentrazione logaritmica delle flore lattiche al termine della fermentazione (nT) rispetto alla stessa concentrazione all'inizio della fermentazione (n0);
- in ascissa (Asse X o asse orizzontale) è rappresentato l'evolversi della durata della fermentazione per ore o frazioni di ora.

Risulta significativo l'effetto inibente rappresentato dal Cefotiofur e dal suo principale metabolita Desfuroylcefotiofur nei confronti delle flore lattiche normalmente presenti nel siero innesto.

In particolare, come riportato in **figura 4**, l'inibizione si è anche tradotta in un "ap-

piattimento" della curva di acidificazione del siero innesto, rappresentata sia da un decremento del pH che da un decremento del valore di Sh°50.

Tale risultato conferma quanto dimostrato nella prova precedente e suggerisce l'ipotesi di verificare se la presenza di Desfuroylcefotiofur ad un livello pari all'Lmr nel latte crudo affiorato destinato alla caseificazione in Grana Padano, possa avere effetto sulla capacità di acidificazione del siero innesto e, conseguentemente, essere una delle possibili cause di alterazioni della struttura nei formaggi ottenuti da simili lavorazioni.

### 3. Effetto degli antibiotici durante la caseificazione

#### a. Effetti sul siero innesto durante la lavorazione

In **figura 5** è riportato lo schema di lavoro applicato per questa specifica fase sperimentale, svolta presso il minicaseificio sperimentale Izslser.

Nel giorno 1, al latte contaminato con

Desfuroylceftiofur a concentrazione pari all'Lmr è stato aggiunto siero innesto di controllo (WS1) per ottenere una forma (Curd1) ed il siero innesto di lavorazione (W1); il giorno 2, il siero innesto WS2 ottenuto dal precedente dopo fermentazione overnight, è stato addizionato a latte addizionato con Desfuroylceftiofur a concentrazione pari all'Lmr per ottenere una seconda forma (curd2) ed il relativo siero innesto di lavorazione (W2); l'intera operazione è stata replicata il giorno 3 ottenendo una terza forma (curd3) ed il relativo siero innesto di lavorazione (W3). L'effetto inibitorio del Desfuroylceftiofur è stato valutato sul siero innesto e sulla cagliata sia determinando la concentrazione di flore lattiche (**Figura 6**) che l'acidità titolabile Sh°50 sul siero di lavorazione e sul siero innesto (**Figura 7**).

La concentrazione di flore lattiche (nel caso specifico Lattobacilli mesofili) risulta significativamente ridotta nel siero innesto e nella cagliata ottenute il giorno 2 e 3 rispetto a quanto ottenuto nel primo giorno

di lavorazione; in particolare nel giorno 1, la concentrazione di flore lattiche nella cagliata (Curd1, ottenuta da latte contaminato ma da siero innesto di controllo) è superiore di oltre 2,5 log ufc/g rispetto alle cagliate ottenute successivamente. Il divario di concentrazione si riduce nelle lavorazioni ottenute nel giorno 3, in quanto derivanti da matrici probabilmente già inibite dalla concentrazione di Desfuroylceftiofur presente nel latte delle precedenti 2 giornate di lavorazione.

La dinamica di concentrazione delle flore lattiche influenza ovviamente anche l'acidificazione del siero di lavorazione (la cui acidità diminuisce progressivamente da W1 a W3) sino a compromettere anche l'acidità del siero innesto ottenuto dalla fermentazione del siero W2.

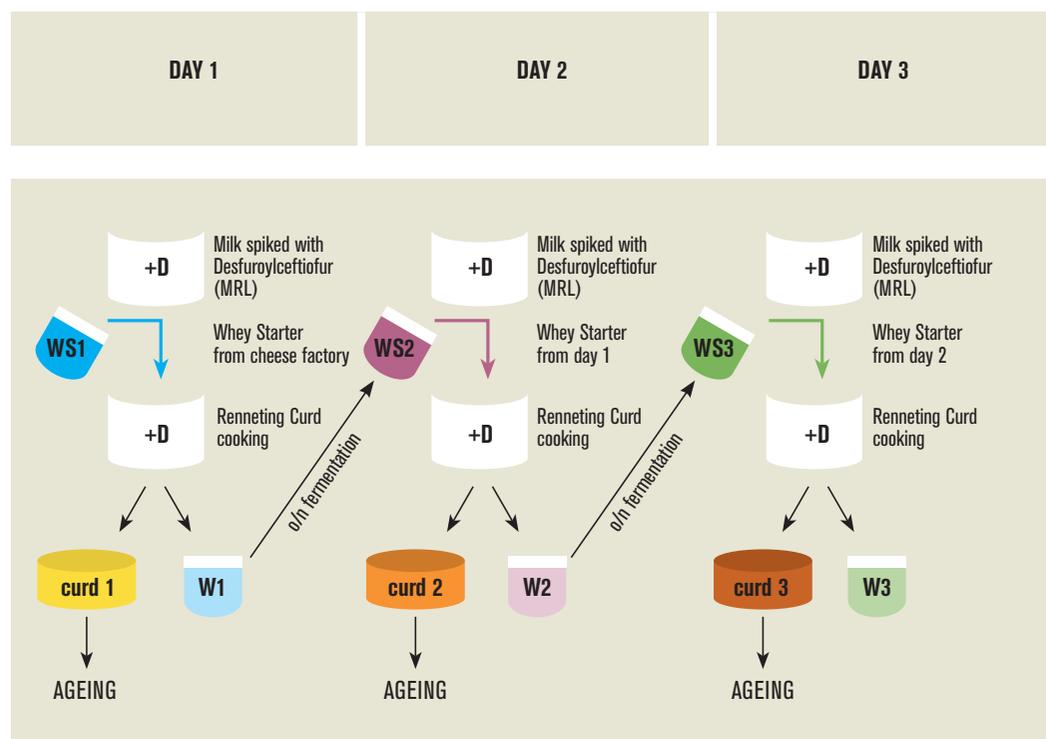
**b. Effetti e persistenza nel prodotto finito**

Le forme ottenute dalla precedente attività sperimentale non hanno consentito du-



**Figura 5. Disegno sperimentale e matrici analizzate nella valutazione degli effetti del Desfuroylceftiofur addizionato a latte destinato alla caseificazione**

(Tratto dalla presentazione orale a 8<sup>th</sup> International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 24th May 2018 Ghent, Belgium)



Le forme del futuro  
Grana Padano nella fase  
della salamoia



Le forme di Grana Padano maturano nel magazzino di stagionatura

rante la stagionatura di apprezzare significative modifiche della struttura, anche in considerazione del fatto che la quantità di latte lavorata era minima e conseguentemente la cagliata ottenuta non era idonea per produrre forme destinate ad una successiva e prolungata stagionatura.

Tuttavia, sulla scorta di quanto precedentemente emerso, si è proceduto con la lavorazione di latte contaminato con Cefquinome a  $2 \times \text{Lmr}$  ( $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) al fine di produrre un formaggio semi-molle in quantità sufficiente a permettere almeno 3 settimane di stagionatura.

Questo esperimento ha permesso in primo luogo di verificare la persistenza della molecola all'interno della pasta della forma; come riportato in **figura 8**, la concentrazione dell'antibiotico pur rimanendo elevata all'interno della cagliata, decade totalmente entro la seconda settimana di stagionatura.

Successivamente, una seconda lavorazione ha permesso di valutare gli effetti sulla struttura del formaggio, partendo da un latte contaminato con Ceftiofur a 2 differenti livelli di contaminazione ( $\text{Lmr}$  e  $0,5 \times \text{Lmr}$ , rispettivamente  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  e  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ): si è potuto osservare come l'effetto di inibizione della molecola nei confronti delle flore lattiche consenta lo sviluppo di microrganismi contaminanti, presumibilmente riconducibili ad Enterobacteriaceae, in grado di produrre alterazioni nella pasta sotto forma di occhiate molto diffuse e persistenti (**Figura 9**).

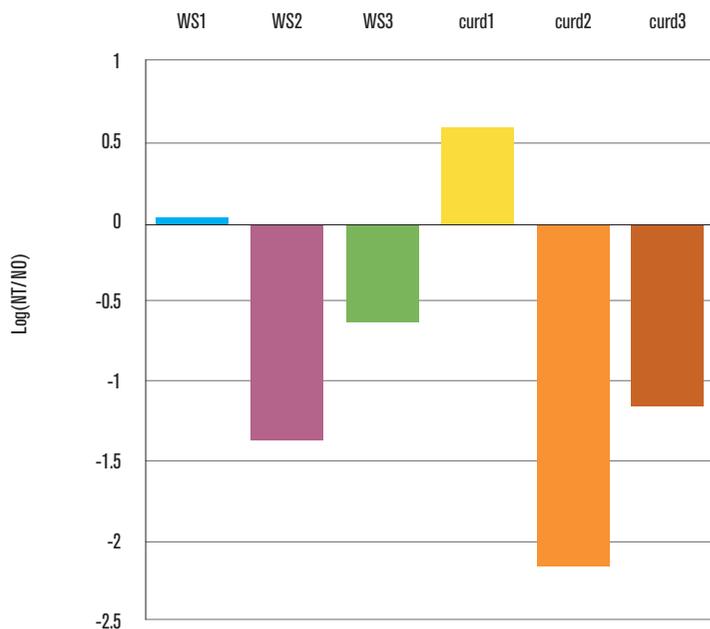
## CONCLUSIONI

L'obiettivo principale del lavoro è stato quello di documentare la necessità, in particolare per certe lavorazioni a Denominazione di origine protetta come il Grana Padano, di definire un limite alla presenza di residui di antibiotici nel latte crudo che sia più consona a prevenire effetti dannosi nella caseifi-

**FIGURA 6. Profilo delle flore lattiche ottenuto nel siero innesto e nella cagliata durante le 3 giornate di lavorazione**

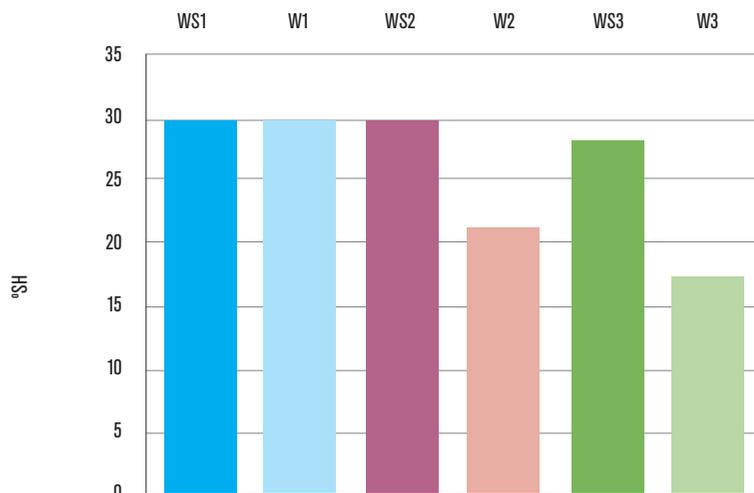
In ordinata la variazione logaritmica (unità formanti colonia / ml di siero) in aumento (+) o in diminuzione (-) rispetto ad un siero di controllo considerando il rapporto tra la concentrazione logaritmica delle flore lattiche al termine della fermentazione (nt) rispetto alla stessa concentrazione all'inizio della fermentazione (n0)

(Tratto dalla presentazione orale a 8<sup>th</sup> International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 24<sup>th</sup> May 2018 Ghent, Belgium)



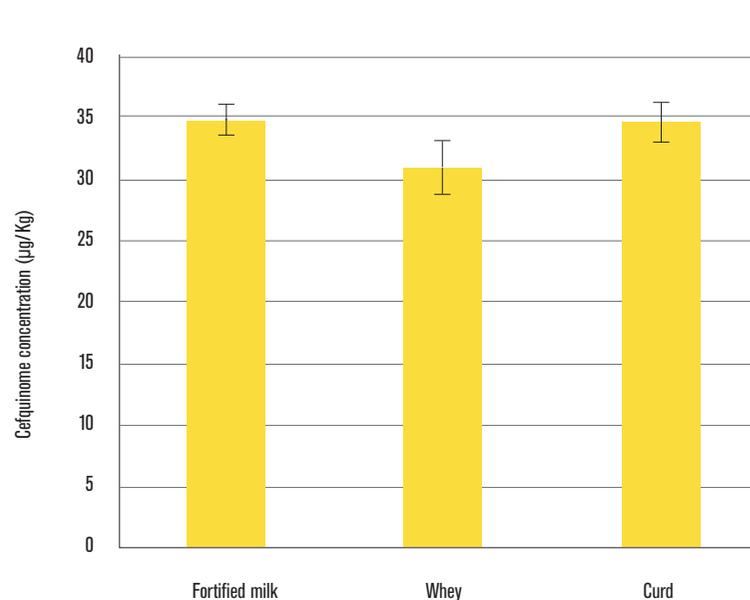
**FIGURA 7. Profilo di acidificazione (sh°50) ottenuto nel siero innesto e nella cagliata durante le 3 giornate di lavorazione**

(Tratto dalla presentazione orale a 8<sup>th</sup> International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 24<sup>th</sup> May 2018 Ghent, Belgium)

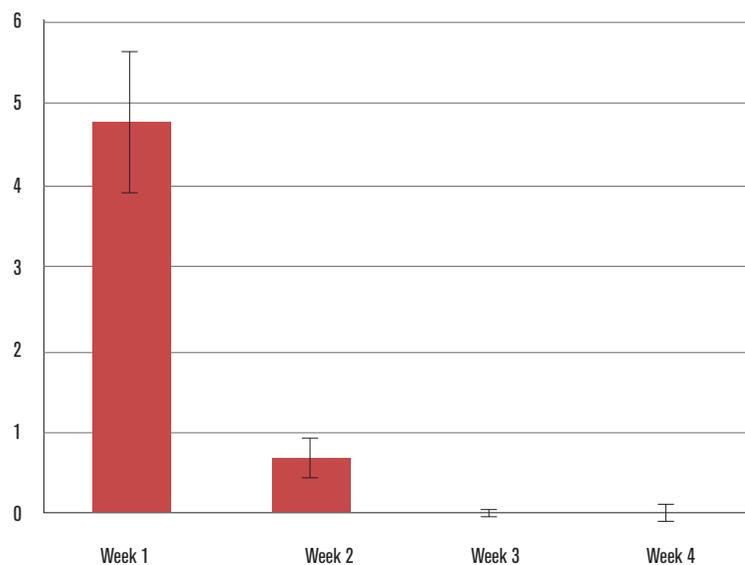


**FIGURA 8. Persistenza di Cefquinome (concentrazione nel latte pari a 2 x lmr) durante la lavorazione e la stagionatura di un formaggio semi molle**

(Tratto dalla presentazione orale a 8<sup>th</sup> International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 24<sup>th</sup> May 2018 Ghent, Belgium)



**AGEING CHEESE WEHEELS**



cazione, limiti anche più restrittivi di quelli imposti dalla legislazione comunitaria.

Se appare infatti certo che gli Lmr costituiscono a tutti gli effetti un parametro igienico-sanitario definito prima di tutto per tutelare la sicurezza del consumatore finale (in funzione del tipo di alimento, delle modalità di consumo, della quantità di prodotto, ma anche della persistenza nel prodotto finale), la produzione di formaggi a latte crudo di assoluto pregio come il Grana Padano, la cui tecnologia è fondata sulla capacità di acidificazione e sulle caratteristiche aromatiche apportate dalle flore lattiche naturalmente presenti nel latte crudo, potrebbe trarre giovamento dalla definizione di limiti “tecnologici” alla presenza di residui di farmaci ed antibiotici, in grado di salvaguardare la naturale attitudine fermentativa delle flore lattiche. I nostri dati implicano, infatti, che i residui di antibiotici ai livelli consentiti pos-

sono ancora porre problemi tecnici all’industria lattiero-casearia.

Inoltre non è da escludere che il deficit fermentativo provocato dalla presenza di residui di farmaci, anche con “tempo di sospensione zero”, si possa tradurre nel lungo periodo in possibili carenze anche dal punto di vista igienico-sanitario, laddove si crei un ambiente all’interno della pasta che non sia più in grado, soprattutto in quei prodotti a media stagionatura, di contrastare la sopravvivenza di microrganismi potenzialmente patogeni per l’uomo.

I risultati esposti, tuttavia, sono il frutto di un lavoro sperimentale che merita maggiori approfondimenti sotto il profilo della numerosità campionaria e della ripetibilità e riproducibilità dei dati ottenuti.

Il presente lavoro è stato reso possibile grazie al contributo del Ministero della Salute grazie al Prc 2013002. ■

**FIGURA 9. Effetto di differenti livelli di Ceftiofur nel latte destinato alla trasformazione sulla struttura del formaggio**

(Tratto dalla presentazione orale a 8<sup>th</sup> International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 24<sup>th</sup> May 2018 Ghent, Belgium)



#### BIBLIOGRAFIA

- A. Bradfield, L. Resi, D.B. Johnstone, J. Dairy Sci 35 (1952), 51-58
- H.R. Withehead and D.J. Lane, J. Dairy Research 23 (1956), 355-360
- L.J- Meanwell, J. appl. Bact. 25 (2) (1962), 128-136
- J.T. Feagan, The Austr. J. of Dairy Tech. (1962), 182-183
- J.L. Albright, S.L. Tuckey, G.T. Woods (1961) *Antibiotics in milk – A review*. Journal of dairy science Volume 44, Issue 5
- G.W. Reinbold and M.S. Reddy, J.Milk Food Technol. 37 (1974), 517-521
- G. Ziv, F. Rasmussen (1975) *Distribution of labelled antibiotics in different components of milk following intramammary and intramuscular administrations*. Journal of Dairy Science volume 8, Issue 6
- S.A. Mcewen, A.H.Meek, W.D.Black, J. of Food Protection, 54 (1991), 454,459;
- L. Rossetti, M.E. Fornasari, M. Gatti, C. Lazzi, E. Neviani, G. Giraffa, Int. J. of Food Microbiology, 127 (2008), 168-171
- M. Gatti, B. Bottari, C. Lazzi, E. Neviani, G. Mucchetti, J. Dairy Sci 97 (2013), 573-591
- J.J. Sheehan (2013) *Milk quality and cheese diversification*. Irish Journal of Agricultural and Food research 52, 243-253
- A. Junza, A. Montané, J. Barbosa, C. Minguillón and D. Barrón (2014) *High resolution mass spectrometry in the identification of transformation products and metabolites from  $\beta$ -lactam antibiotics in thermally treated milk*. Journal of Chromatography A 1368, 89-99
- Commission Regulation (Eu) No 37/2010 of 22 December 2009 Off. J. Eur. Communities L15 (2010); 1-72
- H. Hakk et al, J. Agric. Food Chem. 64 (2016), 326-335
- Codex committee on residues of veterinary drugs in foods, Twelfth Session Session, Washington, D.C., 28 - 31 March 2000 *Control of veterinary drugs in milk and milk products*