

DETERMINAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE PENICILINA NO LEITE ATRAVÉS DE ENSAIO RÁDIO-IMUNOLÓGICO ("CHARM TEST")¹

RUDI WEIBLEN² E SIDNEY L. SPAHR³

ABSTRACT.- Weiblen R. & Spahr S.L. 1982. [Detection of Penicillin in milk with the Radioimmunoassay technique (Charm Test).] Determinação da persistência de penicilina no leite através de ensaio rádio-imunológico ("Charm Test"). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2(4):133-137. Dept. Vet. Pathobiology, College Vet. Med., University of Illinois, Urbana, Illinois 61801, U.S.A.

Eleven dairy cows in different stages of lactation were treated with cefa-lak or cefa-lak combined with Procaine Penicillin G. Four cows treated with cefa-lak were paired with four untreated cows and their milk tested for penicillin residue by the Charm Test. Cows treated with cefa-lak only, had 50% of the samples positive at one sample beyond the withdrawal time. Combination of cefa-lak and Procaine Penicillin G also had positive samples after the recommended withdrawal time. Carry over of penicillin residues through the milking equipment was observed. This finding suggests that milking equipment be completely rinsed after milking treated cows, or that treated cows be milked after untreated cows. Sensitivity of the Charm Test was confirmed and the data indicate that new withholding times should be investigated using more animals, so that a definitive recommendation can be made.

INDEX TERMS: Penicillin, detection in milk, radioimmunoassay technique, Charm Test, cattle.

SINOPSE.- Onze vacas em diferentes fases de lactação foram tratadas com cefa-lak ou cefa-lak em combinação com Penicilina G Procaínada, e quatro vacas tratadas com cefa-lak foram pareadas com quatro outras não tratadas. O leite destes animais foi testado pelo ensaio rádio-imunológico para determinar a persistência de penicilina no leite. Das vacas só tratadas com cefa-lak, 50% apresentaram o leite contaminado por penicilina 108 horas após o tratamento, enquanto que a recomendação do laboratório que produz o medicamento indicava uma retenção do leite por 96 horas o tratamento. Animais tratados com cefa-lak em combinação com Penicilina G Procaínada também apresentaram amostras positivas além das horas recomendadas para a retenção do produto. Foi observado o transporte de Penicilina, através da ordenhadeira, do leite dos animais tratados para o dos não tratados. Esta observação sugere que uma limpeza completa deva ser feita na ordenhadeira após a ordenha de animais tratados para que esta contaminação não aconteça ou, ainda melhor, que todas as vacas tratadas só sejam ordenhadas depois que todas as vacas não medicadas o tenham sido. A eficiência do ensaio foi observada. Os dados sugerem que deva ser estudado um novo período de retenção para estes produtos. Maior número de animais deverá ser utilizado para que possam ser alcançadas conclusões definitivas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Penicilina, determinação no leite, persistência no leite, ensaio rádio-imunológico, Charm Test, bovinos.

INTRODUÇÃO

A presença de antibióticos no leite constitui uma infração da lei, perante o órgão de administração de medicamentos e alimentos (Food and Drug Administration, U.S.A.). A penicilina é uma preocupação especial para os órgãos da saúde pública, nos Estados Unidos, visto que este produto pode produzir reações alérgicas em pessoas sensibilizadas. Foi estimado nos Estados Unidos que 17 a 20 milhões de pessoas podem ter reações alérgicas durante a vida. Possivelmente através de repetidas ingestões de pequenas quantidades de antibióticos em alimentos, especialmente no leite e derivados, as pessoas podem ficar sensibilizadas contra estes medicamentos (Rosa-nove & Stader 1961). Inúmeras reações severas e fatais devidas à penicilina foram observadas e despertaram a atenção em diversos países no mundo inteiro.

Dos antibióticos usuais, a penicilina é dos mais frequentemente encontrados em alimentos. Welch et al. (1957), em levantamento estimativo de âmbito nacional dos Estados Unidos, verificaram que 95% das reações anafiláticas e 85% de outras reações moderadas contra antibióticos eram causadas pela penicilina. Demonstraram também a presença de penicilina em 3,2, 11,6 e 5,9% dos laticínios distribuídos durante os três anos do levantamento. As concentrações encontradas variavam de 0,003 a 0,550 UI por ml, ou até 550 UI por litro.

A administração intramamária de antibióticos é uma das principais fontes de resíduos desses produtos no leite (Ziv et

¹ Aceito para publicação em 1 março de 1982.

² Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine, University of Illinois, Urbana, Illinois 61801, U.S.A.

³ Department of Dairy Science, University of Illinois, Urbana, Illinois 61801, U.S.A.

al. 1974). A eliminação de antibióticos pelo úbere é condicionada pelo tipo de emoliente usado, quantidade de leite produzido, características do produto usado e condição do úbere. A implicação do veículo usado (de rápida ou lenta eliminação) e a concentração do medicamento no leite têm merecido a atenção das autoridades e o assunto tem sido revisado (Mercer et al. 1976).

Os resultados obtidos nas diferentes pesquisas geram contravérsias quanto ao período de retenção do produto e sobre o efeito terapêutico dos diferentes medicamentos usados. Maior concentração do antibiótico e sua persistência por mais tempo é o desejado, do ponto de vista do tratamento, mas a situação é totalmente inversa quando se considera o possível resíduo do antibiótico no leite (Siddique et al. 1965). Vários antibióticos persistem no leite por mais de 96 horas após a administração do medicamento por via intramamária (Albright et al. 1961, Mercer et al. 1970).

A solução para este problema tem sido amplamente pesquisada e o uso de emolientes de rápida eliminação talvez seja a solução, mas provavelmente deverá ser usada uma dose maior do produto para compensar o curto período de ação do antibiótico (Wilkinson 1969). Pesquisadores têm declarado que maiores concentrações de antibióticos e ação mais prolongada destes são desejáveis, mas estas opiniões foram geradas de dados provenientes da concentração do produto no leite; isto talvez não mostre, necessariamente, a concentração e duração de antibióticos no úbere (Ziv 1980).

O úbere bovino é um órgão no qual é difícil estudar o comportamento de medicamentos. O método mais comumente usado é o de medir o índice de eliminação de determinado produto e também a percentagem do antibiótico recuperado no leite (Ziv 1980). Embora exista um grande volume de informações sobre a concentração de antibióticos após aplicação intramamária, dados referentes ao período de recuperação destes, após a aplicação, são bastante limitados. A recuperação de antibióticos no leite é influenciada por diversos fatores. Entre os mais importantes estão o excipiente e o emoliente usados, pois estes componentes determinam a velocidade da liberação do produto no úbere; o tamanho, a quantidade de leite e o índice de absorção do medicamento no úbere são outros fatores interferentes (Ziv 1980).

Presentemente não existe um teste rápido e eficiente para a detecção de antibióticos no leite que possa ser usado por produtores ou em plataformas receptoras de leite. Os fatores limitantes dos testes disponíveis são principalmente os seguintes: a pouca sensibilidade dos testes, insuficientes para a detecção dos níveis desejados, e o longo tempo necessário para sua execução. Através dos anos, diferentes testes foram descritos; cada um foi usado por algum tempo e, depois, abandonado por ter sido suplantado por outro, dotado de maior sensibilidade ou outra vantagem analítica. Tradicionalmente, os testes usados para determinação de penicilina no leite requerem, no mínimo, 3 horas para obtenção dos primeiros resultados. Este longo tempo requerido é um dos maiores obstáculos para a aceitação de tais métodos pelas indústrias de laticínios, pois nenhuma delas pode esperar durante tanto tempo por resultados laboratoriais para só depois descarregar o leite.

Um ensaio rápido para detecção de penicilina no leite ("Charm Test"⁴) foi recentemente descrito (Anonymous 1980) com a informação de que os primeiros resultados podem ser obtidos em 15 minutos, podendo ser analisadas 8 amostras por hora. Abdurahman e Parsons (1980a) fizeram um estudo comparativo do "Disc Assay" e "Difco Assay" com o Charm Test para a detecção de penicilina no leite. O Disc Assay e o Método Difco detectaram penicilina, respectivamente, em apenas 63 e 76% das amostras nas quais o Charm Test no nível O detectou esse antibiótico. O Charm Test detectou penicilina por período mais longo após a aplicação intramamária do produto do que os outros testes usados. Em outro experimento de Abdurahman e Parsons (1980b), foi encontrada boa correlação quando o Disc Assay e o Charm Test foram comparados ao nível de 0,025 por ml. O mesmo Charm Test detectou resíduos de antibióticos no leite por mais tempo e foi também mais sensível que o Disc Assay. Quando 173 amostras de leite foram testadas, menos de 1% delas foram confirmadas positivas para penicilina pelo "Standard Disc Method" (*B. subtilis*) e pelo "Delvotest P ampule method" (*B. stearotermophilus*); para o "Disc Assay" e o "Charm Test", o número de amostras positivas variou: o Disc Assay teve menor número de amostras positivas, e o Charm Test, maior número de amostras positivas (Kelly et al. 1980).

Os objetivos deste estudo foram: a) determinar a presença de penicilina no leite de vacas após tratamento, usando o Charm Test (ensaio rádio-imunológico), b) verificar por quanto tempo a penicilina persiste no leite após o tratamento; c) investigar a possibilidade de transporte de penicilina do leite de uma vaca tratada para o de outra não tratada, através da ordenhadeira.

MATERIAL E MÉTODOS

EXPERIMENTO 1

Amostras de leite foram coletadas de 11 vacas em diferentes fases de lactação, pertencentes ao plantel do Departamento de Zootecnia da Universidade de Illinois, durante 10 ordenhas após o tratamento com penicilina. O leite de cada animal foi coletado em frascos individuais após completa mistura do leite obtido na ordenhadeira. As amostras foram refrigeradas a 4°C até serem testadas no mesmo dia da coleta.

Tratamento dos animais

Oito vacas foram tratadas com cefa-lak (cephapirin sodium) 200 mg⁵. O produto foi injetado no quarto mamário afetado com mastite, segundo recomendação do fabricante. O período para a retenção do leite após o tratamento, para este produto, é de 96 horas.

Três vacas foram tratadas com cefa-lak 200 mg em cada quarto mamário afetado com mastite e mais 50 ml de Penicilina Procainada IM (Procaine Penicillin G USP in aqueous suspension pen-aqueous). Cada ml de Procaine Penicillin G tem 300.000 UI com 0,12% Methylparaben e 0,014% Propylparaben como preservativo⁶; este medicamento, segundo o fabricante, tem um período de retenção de 72 horas após o tratamento.

⁴ Penicillin Assays Inc., Boston, Massachusetts 02111, USA.

⁵ Bristol Laboratories, Syracuse, New York 13201, USA.

⁶ Med. Tech. Inc., Elwood, Kansas 66024, USA.

EXPERIMENTO 2

Quatro animais tratados e quatro não tratados foram pareados, e amostras de leite foram coletadas durante quatro ordenhas consecutivas, usando-se a mesma metodologia empregada na primeira etapa.

Procedimento

Quatro vacas tratadas com cefa-lak 200 mg por quarto mamário afetado foram pareadas com quatro vacas não tratadas. As vacas não tratadas foram ordenhadas após a ordenha das vacas tratadas sem se lavar a ordenhadeira entre as ordenhas de cada par de animais.

*Charm Test (RIA) para detecção de penicilina no leite**Reagentes*

Reagente A: carbono radioativo 14. O diluente A foi acondicionado ao reagente A, seguindo instruções do fabricante; a preparação foi feita à temperatura ambiente até obter-se perfeita homogeneização e conservado em gelo enquanto em uso. As sobras não usadas no mesmo dia foram conservadas a -20°C até que seu uso fosse oportuno.

Reagente B: O diluente B foi adicionado ao reagente B à temperatura ambiente, seguindo indicações do fabricante. Após adicionar o primeiro ml, a suspensão foi agitada em agitador mecânico. A suspensão foi então completada e homogeneizada com uma pipeta, para assegurar a perfeita diluição do reagente, e incubada por 5 minutos antes de entrar em uso. As sobras não necessarias para a rotina diária foram conservadas a -20°C .

Solução padrão

O leite controle zero foi preparado em água morna, a partir do leite em pó seguindo as instruções do fabricante. O leite assim preparado era refrigerado para assegurar que todas as amostras estivessem nas mesmas condições quando testadas. Em 100 ml do leite controle zero, eram adicionados 0,05 u/ml da solução padrão. A solução padrão, a 0,008 u/ml, foi conseguida mediante adição de 8 ml de uma solução a 0,05 u/ml em 42 ml do leite controle zero. Todo o equipamento e reagentes usados foram obtidos de Penicillin Assays⁷.

Preparação preliminar

Os reagentes A e B só eram utilizados após incubação por 5 minutos, a contar da preparação, sendo novamente homogeneizados antes do uso. O bloco metálico perfurado era aquecido à temperatura de 90°C . A chapa quente era aquecida a uma temperatura tal que 0,3 ml de água evaporassem rapidamente de um cadinho metálico raso colocado sobre ela. A centrífuga era ligada à velocidade máxima, segundo recomendação do fabricante.

A execução do Charm Test

Pipetam-se 5 ml do leite cru para cada tubo de 13 x 100 mm. Adicionam-se a cada tubo 0,2 ml do reagente A, agitando-se a suspensão no agitador mecânico. Adicionam-se, em seguida, 0,2 ml do reagente B a cada tubo e homogeneiza-se completamente a solução.

Os tubos são colocados no bloco metálico perfurado por 3 minutos a 90°C . Do bloco os tubos são transferidos para a centrífuga e centrifugados por 4 minutos à velocidade máxima. Elimina-se o sobrenadante e lava-se cada tubo por duas vezes, com bastante cuidado para não dispersar o precipitado, depositado no fundo. Após duas lavagens, adicionam-se 0,3 ml de água ao tubo, que é agitado para ressuspender completamente o precipitado. Despeja-se o conteúdo no cadinho, que é colocado sobre a chapa quente. Lava-se o tubo por mais duas vezes, para assegurar que todo o precipitado seja transferido do tubo para o cadinho que, após ficar completamente seco, é inserido no analisador de penicilina por 8 minutos.

Para a determinação de resultados positivos ou negativos levou-se em consideração a média das amostras padrão 0,008 u/ml para os dias

em que as amostras foram analisadas. Leituras que ficavam a 1 desvio padrão da média, abaixo ou acima desta, foram chamadas de valores críticos.

RESULTADOS

Tratamento de vacas com cefa-lak

Resultados das amostras de leite coletadas de oito vacas tratadas com cefa-lak estão sumarizados no Quadro 1. O antibiótico foi detectado até 120 horas após o tratamento em uma vaca, e em 50% das vacas registraram-se amostras positivas 108 horas após o tratamento intramamário com cefa-lak.

Tratamento de vacas com cefa-lak e penicilina procainada

Animais que foram tratados com cefa-lak e penicilina procainada apresentaram amostras positivas até 120 horas após o tratamento. Todas as três vacas tratadas apresentaram amostras positivas até a sexta ordenha pós-tratamento; em duas delas, as amostras permaneceram positivas até a décima coleta após o tratamento. Estes resultados estão sumarizados no Quadro 2.

Transporte de antibióticos do leite de vacas tratadas para o das não tratadas

Amostras de leite de quatro vacas tratadas e de quatro não tratadas, coletadas sem lavagem da ordenhadeira, foram analisadas pelo Charm Test. O transporte do antibiótico foi detectado no leite de todas as vacas não tratadas.

Na primeira e segunda coletas, 50% das amostras de leite dos animais não tratados continham resíduos do antibiótico, quando testadas pelo Charm Test. Na terceira amostragem pós-tratamento, o leite de todas as vacas apresentou-se contaminado com antibióticos quando testado pelo Charm Test. Na quarta amostra coletada do grupo controle, o leite já não estava mais contaminado quando testado pelo ensaio rádio-imunológico. Os resultados encontram-se no Quadro 3.

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo determinar a presença de penicilina no leite usando o Charm Test. Vacas que foram tratadas com cefa-lak (Quadro 1) apresentaram todas as amostras de leite contaminadas por penicilina 36 horas após o tratamento, duas vacas apresentaram amostras positivas a 96 horas pós-tratamento e quatro apresentaram penicilina no leite 108 horas pós-injeção. O período de retenção deste produto, segundo o fabricante, é de 96 horas; portanto, 50% dos animais apresentaram penicilina no leite após o período de retenção recomendado pelo fabricante.

Segundo as leis americanas, isto representa alteração no produto, não importando se esta quantidade é suficiente para desencadear uma reação alérgica num indivíduo sensibilizado. A razão da eliminação intermitente da penicilina no leite, por algumas vacas tratadas, não é conhecida e necessita futuras investigações. O Charm Test é um teste qualitativo e não quantitativo e para saber-se a quantidade de antibiótico eliminado, outro teste teria de ser empregado. Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por Abdurahman e Parsons (1980a).

⁷ Penicillin Assays Inc., Boston, Massachusetts 02111, USA.

Quadro 1. Antibióticos no leite após injeção intramamária, detectados pelo Charm Test (Experimento 1)

Identificação do animal	Tratamento	Resultados apresentados pelas amostras de leite colhidas nas dez primeiras ordenhas após o tratamento									
		1ª (12h)	2ª (24h)	3ª (36h)	4ª (48h)	5ª (60h)	6ª (72h)	7ª (84h)	8ª (96h)	9ª (108h)	10ª ordenha (120h)
3285	200 mg de cephapirin PD, PE ^(a)	+(b)	+	+	-	+	+	-	-	+	?
3668	" PD	+	+	+	+	?	+	?	+	-	-
3723	" PD	+	+	+	+	+	-	?	-	-	-
3804	" PE	+	+	+	+	+	?	+	?	-	-
3723	" PD	+	+	+	+	?	+	-	-	-	-
3804	" PE	+	+	+	+	+	-	?	?	+	?
4229	" AE	+	+	+	+	+	+	+	-	-	?
3991	" AE, PE, PD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Número de amostras positivas		8/8	8/8	8/8	7/8	6/8	5/8	3/8	2/8	4/8	1/8
% positivas		100	100	100	87,5	75	62,5	37,5	25	50	12,5

(a) PD quarto posterior direito, PE quarto posterior esquerdo, AE quarto anterior esquerdo.

(b) + positivo, - negativo, ? valores críticos.

Quadro 2. Antibióticos no leite após injeção intramamária, detectados pelo Charm Test, e tratamento parenteral (Experimento 1)

Identificação do animal	Tratamento	Resultados apresentados pelas amostras de leite colhidas nas dez primeiras ordenhas após o tratamento									
		1ª (12h)	2ª (24h)	3ª (36h)	4ª (48h)	5ª (60h)	6ª (72h)	7ª (84h)	8ª (96h)	9ª (108h)	10ª ordenha (120h)
3991	200 mg de cephapirin PE ^(a) e 50 ml de penicilina procainada IM	+(b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3962	200 mg de cephapirin PD e 50 ml de penicilina procainada IM	+	+	+	+	+	+	-	-	?	+
3968	200 mg de cephapirin PE e 50 ml de penicilina procainada IM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
Número de amostras positivas		3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	2/3	2/3
% positivas		100	100	100	100	100	100	66,7	66,7	66,7	66,7

(a) PD quarto posterior direito, PE quarto posterior esquerdo.

(b) + positivo, - negativo, ? valores críticos.

Estes autores observaram que em todos os casos testados o leite estava contaminado com antibióticos duas ordenhas além do período de retenção recomendado pelo fabricante, quando as amostras foram testadas pelo Charm Test. A retenção recomendada, no trabalho dos citados autores, indicava o uso do leite somente 60 horas após o tratamento. No nosso caso, observamos 50% das amostras positivas (4/8) 108 horas pós-tratamento, e somente uma amostra (12,5%, 1/8), 120 horas pós-tratamento. O animal que apresentava penicilina 120 horas pós-injeção intramamária tinha sido tratado em três quartos (AE, PE, PD); talvez esta seja a razão pela qual este animal apresentou penicilina na última amostra de leite coletada.

Mercer et al. (1976) constataram que a eliminação de antibiótico do úbere depende do emoliente usado, da quantidade de leite produzido e da condição do úbere. Antibióticos com maior concentração são recomendados para casos mais severos, mas esta condição inverte-se quando se considera a possível contaminação pós-tratamento. Para este caso o ideal seria o uso de antibióticos em menor concentração (Siddique et al. 1965).

O tratamento combinado de cefa-lak e penicilina procainada (Quadro 3) usado em três vacas apresentou todas as amos-

tras positivas até a sexta ordenha (72 horas pós-tratamento). O período de retenção para a penicilina procaina é de 72 horas. Como cefa-lak também havia sido usado, era de esperar-se que as amostras permanecessem positivas por mais tempo. O período de retenção para este último produto é de 96 horas, talvez a alta percentagem de amostras positivas seja devida à combinação dos dois medicamentos usados ou à grande dose de penicilina procainada usada nos animais do Quadro 2. Outra razão pode ser a excelente sensibilidade do teste, como foi observado por Abdurahman e Parsons (1980a).

No estudo do transporte de antibióticos através da ordenha-deira, fatos surpreendentes foram encontrados. Na primeira amostra coletada, dois animais do grupo controle continham penicilina no leite, e na segunda amostra os mesmos animais encontravam-se positivos. Fato inesperado ocorreu na terceira amostra coletada, pois os quatro animais controles tinham penicilina no leite, quando testados pelo Charm Test. Levando-se em consideração estes fatos, recomenda-se que todo equipamento de ordenha que tenha contato com leite contaminado seja completamente lavado antes de ordenhar-se vacas não tratadas. Melhor ainda seria que todos os animais tratados só fossem ordenhados após a ordenha de todas as vacas sadias.

Quadro 3. Transporte de antibiótico do leite de animais tratados para o de animais não tratados através da ordenhadeira, revelado pelo Charm Test (Experimento 2)

Identificação do animal	Condição	Resultados apresentados pelas amostras de leite colhidas nas quatro primeiras ordenhas após o tratamento				Número de amostras positivas	% de amostras positivas
		1 ^a (12h)	2 ^a (24h)	3 ^a (36h)	4 ^a ordenha (48h)		
3796	200 mg de cephapirin AE ^(a)	+(b)	+	+	+	4/4	100
3818	Controle	+	+	+	-	3/4	75
3285	200 mg de cephapirin AE	+	+	+	+	4/4	100
3790	Controle	+	+	+	-	3/4	75
3791	200 mg de cephapirin PE	+	+	+	+	4/4	100
3944	Controle	-	-	+	-	1/4	25
3821	200 mg de cephapirin PD	+	?	+	-	2/4	50
3916	Controle	-	-	+	-	1/4	25

(a) PD quarto posterior direito, PE quarto posterior esquerdo, AE quarto anterior esquerdo.

(b) + positivo, - negativo, ? valores críticos.

REFERÊNCIAS

- Abdurahman E. & Parsons J.G. 1980a. Comparative evaluation of the Disc Assay, Difco Disc Assay and Charm Test for detecting penicillin in milk. *J. Dairy Sci.* 63, Suppl. 1:39.
- Abdurahman E. & Parsons J.G. 1980b. Duration of antibiotics in milk from cows treated via intrauterine infusion. *J. Dairy Sci.* 63, Suppl. 1:39-40.
- Albright J.L., Tuckey S.L. & Woods G.T. 1961. Antibiotics in milk. A review. *J. Dairy Sci.* 44:779-807.
- Anonymous 1980. Tests for antibiotics in milk. *Am. Dairy Review*, Aug./Dec.
- Kelly D.G., Gough R.H. & Gholson J.H. 1980. Testing for penicillin residue in milk. *J. Dairy Sci.* 63, Suppl. 1:171.
- Mercer H.D., Geleta J.N., Schultz E.J. & Wright W.W. 1970. Milk-out rates for antibiotics in intramammary infusion products used in the treatment of bovine mastitis. Relationship of somatic cell counts, milk production level, and drug vehicle. *Am. J. Vet. Res.* 31:1549-1560.
- Mercer H.D., Geleta J.N., Baldwin R.A. & Shimoda W. 1976. Viewpoint and current concepts regarding accepted tried products for control of bovine mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 169:1104-1114.
- Rosanove R. & Stader R. 1961. Antibiotics in milk after mastitis therapy. *Aust. Vet. J.* 37:345-348.
- Siddique I.H., Loken K.I. & Hoyt H.H. 1965. Concentrations of Neomycin, Dihydrostreptomycin, and Polymyxin in milk after intramuscular or intramammary administration. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 146:594-599.
- Welch H., Lewis C.N., Weisten H.I. & Boeckman B.B. 1958. In: H. Welch & F. Marti-Ibanez (ed.) *Antibiotics Annual*. Medical Encyclopedia Inc., New York.
- Wilkinson F.C. 1969. Dry cow therapy in bovine mastitis. *Aust. Vet. J.* 45:433-434.
- Ziv G., Gordin S. & Bechar G. 1974. Mode of transfer of antibiotics from treated to non-treated quarters in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 35:643-647.
- Ziv G. 1980. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy. 3. Intramammary treatment. *V.M./SC.* 75:657-670.