

EMPREGO DO CEFTIOFUR SÓDICO OU DA ESTREPTOMICINA PARA A TERAPIA DA LEPTOSPIROSE EM HAMSTERS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM O SOROVAR POMONA*

G.O. Santos¹, F. Cardoso, S.A. Vasconcellos, Z.M. Morais, A. Cortez, A.C. M. Fávero, F. Miraglia, S.R. Pinheiro, C.A.A. Amos

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

O ceftiofur sódico ou a estreptomicina foram empregados para a terapia da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com uma estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar pomona. O inóculo infectante foi ajustado para a média de 20 a 30 leptospiros por campo, aumento de 200 vezes. Na primeira etapa um grupo de animais foi tratado com uma única aplicação de estreptomicina na dose de 25mg/kg de peso vivo, via intramuscular e outro com o ceftiofur sódico em uma ou duas aplicações de 20mg/kg de peso vivo, via intramuscular. Na segunda etapa, o ceftiofur sódico foi empregado em uma única aplicação das concentrações de 30 ou 40 mg/kg de peso vivo, via intramuscular. Na terceira etapa o ceftiofur sódico foi empregado em uma única aplicação de 25mg/kg, de peso vivo, via intramuscular em hamsters inoculados com diferentes concentrações de leptospiros, série de cinco diluições geométricas de razão dez. Em todas as etapas a primeira aplicação do antibiótico foi efetuada 48 horas após o estabelecimento da infecção experimental. Os hamsters foram mantidos em observação atentando-se para a presença de sinais clínicos da leptospirose. Os que adoeceram foram sacrificados na fase agônica e a infecção foi confirmada através da constatação da presença de leptospiros no macerado de tecido hepático ou renal. Os animais que não apresentaram sinais clínicos foram sacrificados no 21º ou 30º dia pós-infecção, quando foi investigada a condição de portador renal de leptospiros. A técnica das diluições seriadas em meio de Fletcher foi empregada para a demonstração da presença de leptospiros em cultivos de tecido renal. A microtécnica de soroaglutinação microscópica, com antígenos vivos, foi utilizada para a pesquisa de aglutininas, séricas, anti leptospiros. Os resultados obtidos confirmaram a atuação da estreptomicina para o controle da leptospirémia e da leptospirúria em uma única aplicação na concentração de 25 mg/kg de peso vivo. O ceftiofur sódico na concentração de 20 mg/kg de peso vivo, uma ou duas aplicações com intervalo de 24 horas, não foi eficiente para sustar a evolução da infecção mas, nas concentrações de 25, 30 e 40 mg/kg de peso vivo, uma única aplicação, foi capaz de impedir a manifestação da doença. Uma única aplicação do ceftiofur sódico na dose de 25mg/kg de peso vivo foi capaz de eliminar a infecção renal em 48 dos 50 animais inoculados com diferentes concentrações de leptospiros.

PALAVRAS-CHAVE: Leptospirose, hamster, tratamento, estreptomicina, ceftiofur sódico.

ABSTRACT

USE OF CEFTIOFUR SODIUM OR STREPTOMYCIN FOR THE TREATMENT OF HAMSTERS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *L. INTERROGANS* SEROVAR POMONA. The use of ceftiofur sodium or streptomycin for treatment of leptospirosis was investigated in hamsters (*M. auratus*) experimentally infected with *L. interrogans* serovar pomona. The inoculi of leptospirae for infection was adjusted for a dilution that presents the median of 20 to 30 microorganisms per microscopic field, 200 times magnification. In the first experiment one group of animals received one dose of streptomycin, at the concentration of 25 mg/kg body weight by the intramuscular route and the other was treated with one or two intramuscular injections of ceftiofur sodium, 20 mg/kg body weight, each 24 hours. In the second experiment the ceftiofur sodium was tested in one intramuscular dose of 30 or 40 mg/kg/body weight. In the third experiment it was investigated one

*Trabalho realizado com apoio do CNPq, Bolsa de Aperfeiçoamento RHAÉ. Processo (160141/97-4)

intramuscular dose of ceftiofur sodium at the concentration of 25 mg/kg/ body weight, against five serial dilutions of the leptospires inoculi. In all of the three experiments the first antimicrobial treatment was performed 48 hours after the infection with leptospires. The hamsters were observed two times a day searching for signs of the infection (weakness, hemorrhagies, icterus, incoordination). When they became ill they were killed at the moribund stage of the disease and the leptospiral infection was atested by the demonstration of the microorganisms in liver or kidney suspensions examined under dark field microscopy. The animals that presented no signs of the disease were killed in the 21st or 30th post infection day, and at this time it was investigated the presence of leptospires by cultivation of kidney samples and the presence of agglutinines in blood by the microscopic agglutination test. The results showed that streptomycin as able to stop the development of the infection with no kidney carriers in the survivors. With the ceftiofur sodium the lowest effective dose was one intramuscular injection of 25 mg/kg/body weight. All of the animals treated with this concentration presented no signs of infection and 96% (48/50) of them presented no leptospires in kidney cultures performed at the 21 post infection day.

KEY WORDS: Leptospirosis, hamster, streptomycin, ceftiofur sodium.

INTRODUÇÃO

A terapia dos animais acometidos pela leptospirose objetiva não somente o restabelecimento do doente mas, particularmente, a eliminação da infecção renal que propicia a contaminação do ambiente (GUIMARÃES *et. al.*, 1982/83).

A destruição das leptospirosas localizadas nos rins requer um agente terapêutico que seja, pelo menos, parcialmente eliminado do sangue, através da filtração glomerular, de tal modo que concentrações leptospiricidas atinjam o fluido dos túbulos proximais espiralados e o comprimento do nefrônio (STALHEIM, 1966b).

A penicilina é eliminada pela urina principalmente por excreção tubular e somente cerca de 20% por filtração glomerular. Das tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina ou terramicina e clortetraciclina ou aureomicina) de 5 a 30% atravessam o filtro renal. Da tilosina e lincomicina 11% e 16%, respectivamente, são eliminados pelos rins. A maior parte da eritromicina é eliminada pelo canal da bile. O cloranfenicol é excretado principalmente pelos rins, mas como um derivado do ácido glicurônico que é inativo (STALHEIM, 1966a; STALHEIM, 1966b).

A dihidroestreptomicina e a estreptomicina não são metabolizadas pelo organismo animal, e são eliminadas principalmente por filtração glomerular, não havendo reabsorção tubular (JONES, 1969). A capacidade de excreção renal da dihidroestreptomicina, sob forma ativa, é inclusive superior a da estreptomicina (JONES, 1969).

WARREN *et al.* (1955) analisaram, "in vitro", o efeito de concentrações variáveis de estreptomicina frente a diferentes sorovares de leptospira. Os sorovares grippotyphosa e pomona mostraram-se muito resistentes e os sejeoe e icterohaemorrhagiae foram altamente sensíveis.

STALHEIM (1966b), verificou que a *Leptospira interrogans* sorovar pomona foi eliminada dos rins de

hamsters experimentalmente infectados e tratados durante três dias, com uma dose diária de dihidroestreptomicina (25mg/kg de peso vivo).

CACCHIONE (1969), em cobaias experimentalmente infectadas com *Leptospira interrogans* sorovar copenhageni, constatou a eficiência da administração diária de estreptomicina, na dose de 30 mg/Kg de peso vivo, pela via subcutânea, durante quatro dias.

STALHEIM, (1972); STALHEIM (1975) observou que o tratamento com dihidroestreptomicina, via intramuscular, em hamsters experimentalmente infectados com os sorovares pomona, hardjo e grippotyphosa, apresentou igual eficiência na eliminação da leptospirúria, sugerindo que a eficácia do antibiótico não dependia do sorovar infectante.

ALEXANDER & RULE (1987) investigaram comparativamente a atuação de 14 antimicrobianos, com vistas ao tratamento da leptospirose em hamsters adultos experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar bataviae. As drogas foram inicialmente administradas nas concentrações de 10, 40 e 160 mg/kg, cada uma, em dose única, subcutaneamente ou oral, em grupos de três hamsters, no segundo dia da infecção. As drogas ativas (animais tratados sobreviveram por até 21 dias após a infecção): ampicilina, mezlocilin, doxiciclina, moxalactam, clortetraciclina, cefotaxime, bacampicilina, piperacilina e ciclacilina foram estudadas para avaliar o tratamento tardio da leptospirose, até quatro a cinco dias após a infecção, usando as dosagens de 5 e 2,5mg/kg/dia durante cinco dias, pela via subcutânea ou oral. Todas as nove drogas testadas preveniram a morte dos hamsters quando os mesmos foram tratados até um a 2,5 dias antes do período esperado de morte. Em animais tratados com ampicilina, bacampicilina, mezlocilin, cefotaxime e moxalactan não houve a presença de leptospirosas nos rins.

A despeito da estreptomicina ser indicada para o controle da leptospirúria, a dosagem recomendada pode resultar em resíduos inaceitáveis (ALT & BOLIN, 1996).

ALEXANDER & RULE (1987), utilizaram hamsters adultos experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar bataviae, tratados durante quatro a cinco dias com agentes antimicrobianos, dentre os quais estavam incluídas algumas cefalosporinas como a cefatoxime (primeira geração), o cefadroxil e o moxalactam (ambas de terceira geração), e comprovaram que estas drogas impediram a instalação da infecção sistêmica e a colonização dos túbulos renais.

O EXENEL®, ceftiofur sódico é uma cefalosporina de terceira geração, indicado para o combate às infecções do trato respiratório de ovinos na dose de 2,2 mg/kg de peso vivo em intervalos de 24 horas (BECONI-BARKER *et al.*, 1994). No entanto, em hamsters experimentalmente infectados, essa dose, aplicada durante três dias, não foi suficiente para combater a leptospirose (ALT & BOLIN, 1996).

O ceftiofur sódico é metabolizado no desfuroilceftiofur (DFC), produto ativo, que é excretado principalmente para a bexiga e eliminado através da urina, a parte restante, cerca de 39%, liga-se às macromoléculas permanecendo nos tecidos como resíduo, mas em níveis aceitáveis segundo os limites estabelecidos pelo FDA/ EUA (BECONI-BARKER *et al.*, 1994).

ALT & BOLIN em 1996, analisaram o emprego do ceftiofur sódico para o tratamento da leptospirose em hamsters experimentalmente infectados com o sorovar pomona. Apenas houve bom resultado para o controle da leptospirose quando o produto foi utilizado na concentração diária de 20mg/kg de peso vivo e no regime de três aplicações em dias consecutivos.

O emprego de diversas doses de um produto destinado ao controle da leptospirose, é um grande entrave prático para o combate da doença nos rebanhos animais. O ideal para o tratamento massal é a aplicação do menor número de doses possíveis. Está é a forma como a estreptomicina é preconizada: uma única aplicação de 25mg/kg de peso vivo (STALHEIM, 1969; GERRITSEN, 1994).

Deste modo o presente trabalho se propõe, a verificar comparativamente a eficiência terapêutica do ceftiofur sódico e da estreptomicina no controle da leptospirose em hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar pomona, analisando-se os efeitos de uma ou duas aplicações da cefalosporina frente a dosagem tradicional de estreptomicina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados 214 hamsters (*Mesocricetus auratus*) púberes, machos, com 80 a 120 gramas de peso vivo.

Inóculo: Foi utilizada a estirpe virulenta de *Leptospira interrogans* sorovar pomona preservada conforme CAMARGO *et al.* (1993). O inóculo foi preparado a partir do macerado de tecido hepático de hamsters experimentalmente infectados e sacrificados na fase agônica da doença. A diluição do inóculo foi ajustada para conter a média de 20 a 30 leptospirose por campo microscópico, aumento de 200 vezes. A diluição escolhida para a primeira etapa foi a 10^{-3} , para a segunda etapa foi a 10^{-2} . Na terceira etapa foram empregadas cinco diluições seriadas de razão dez (10^{-1} a 10^{-5}). Cada animal recebeu o volume de 0,5 ml do respectivo inóculo, pela via intraperitoneal.

Placebo: O placebo para o inóculo de leptospirose foi a suspensão a 10% de tecido hepático de hamsters não infectados. O placebo dos antibióticos foi a solução de cloreto de sódio 0,85%.

Antibióticos: Os antibióticos utilizados foram Exenelâ (ceftiofur sódico) nas concentrações de 20, 25, 30 e 40mg/kg de peso vivo e a estreptomicina, na concentração de 25mg/kg de peso vivo. Para ambas as drogas, a via de administração adotada foi a intramuscular (BOOTH & MCDONALD 1988). A primeira aplicação do antibiótico foi efetuada 48 horas após o estabelecimento da infecção experimental. Não foi feita prova de toxicidade dos antibióticos empregados, independentemente da dose utilizada, porque nenhum dos animais observados apresentou qualquer alteração clínica que sugerisse efeitos tóxicos.

Técnica para isolamento de leptospirose em meio de cultura: Foi empregada a técnica de diluições seriadas, onde as suspensões de tecido renal foram examinadas nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Para cada diluição foram inoculados dois tubos contendo o meio de Fletcher. A incubação foi efetuada à temperatura de 28 a 30°C durante seis semanas com exames, semanais, em microscopia de campo escuro (SANTA ROSA, 1970).

Microtécnica de Soroaglutinação Microscópica com Antígenos Vivos: Foi utilizada para a determinação dos níveis de anticorpos séricos anti-leptospirose (GALTON *et al.*, 1965.). Os soros foram testados com a própria estirpe virulenta *L. interrogans* sorovar pomona utilizada como inóculo. O ponto de corte da reação foi a diluição 1:100. A titulação das amostras reagentes utilizou uma série geométrica de diluições de razão dois. O título foi a recíproca da maior diluição do soro com 50% de leptospirose aglutinadas.

Tratamento estatístico: As médias aritméticas dos períodos de observação dos animais infectados e

que morreram por leptospirose, bem como as médias geométricas dos títulos de aglutininas anti-leptospira dos animais que resistiram a infecção foram comparadas pelos testes Mann-Whitney, análise de variância ou teste de Kruskal-Wallis, quando indicados, programa Graphpad-Instat.

Delineamento experimental da primeira etapa:

Quarenta e quatro hamsters foram inoculados pela via intraperitoneal com 0,5 mL de inóculo de leptospirosas vivas. No segundo dia pós inoculação (pi.), 14 hamsters foram tratados com a estreptomina, na dose de 25 mg/kg de peso vivo (STALHEIM, 1966b), uma única aplicação via intramuscular, e 30 hamsters com o ceftiofur sódico, na dose de 20 mg/kg (ALT & BOLIN, 1996), uma aplicação via intramuscular e no dia seguinte apenas 15 desses 30 animais receberam uma segunda aplicação da mesma dose do produto. Como controles foram utilizados 24 hamsters.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas forradas com cama de maravalha, água da rede pública e ração comercial, com observações diárias. Os que adoeceram foram sacrificados na fase agônica e tiveram a confirmação da leptospirose através da demonstração da presença do agente no tecido hepático ou renal em microscopia de campo escuro.

Decorridos 21 dias da inoculação os sobreviventes foram (anestesiados) em câmara com vapores de éter, foi efetuada a colheita de sangue por punção cardíaca e, em seguida, o sacrifício mediante o aprofundamento da anestesia. Após o sacrifício os animais foram necropsiados para a colheita dos rins para a pesquisa da condição de portador renal através do cultivo em meio de Fletcher. Os soros e rins dos animais que morreram antes dos 21 dias p.i. não foram submetidos aos exames de cultivo e sorologia.

Delineamento experimental da segunda etapa:

Vinte e quatro hamsters foram inoculados pela via intraperitoneal com 0,5 mL de leptospirosas vivas; no segundo dia pós infecção, 12 animais foram tratados com uma única aplicação do ceftiofur sódico na dose de 30 mg/kg de peso vivo e outros 12 com uma única aplicação deste mesmo produto na dose de 40 mg/kg de peso vivo. Como controles foram utilizados 16 animais. Os animais foram mantidos em observação por 30 dias nas mesmas condições da etapa anterior.

Delineamento experimental da terceira etapa:

Foram inoculados 100 hamsters pela via intraperitoneal com 0,5 mL de leptospirosas vivas; os animais foram divididos em dez grupos contendo dez animais cada. Conjuntos de dois grupos receberam o inóculo de leptospirosas em concentrações seriadas sucessivas de 10^{-1} a 10^{-5} . No segundo dia após a inoculação 50 animais (grupos 1 a 5) foram tratados

com uma aplicação intramuscular de ceftiofur sódico na concentração de 25 mg/kg de peso vivo e outros 50 animais (dos grupos 6 a 10) receberam placebo (solução salina). A observação dos animais foi diária e nas mesmas condições das etapas anteriores.

RESULTADOS

Primeira etapa: Os hamsters inoculados e tratados com uma única aplicação de ceftiofur sódico na concentração de 20mg/kg de peso vivo começaram a morrer por leptospirose (10 animais em 15) a partir do quarto dia pós-infecção (pi.); apresentavam sintomas clínicos típicos da leptospirose experimental não sendo feita a sorologia e a pesquisa do agente do material renal. Os hamsters do grupo tratado com duas aplicações desse mesmo produto, começaram a morrer a partir do quinto dia (pi), num total de 10 animais em 15. Apresentavam sintomas clínicos sugestivos de leptospirose e, também neste caso, não foram realizadas as provas de sorologia e cultivo de leptospirosas. Estas provas foram realizadas nos animais sobreviventes (sacrificados no 21º dia p.i.) para verificar a condição de portador. Todos os sobreviventes, 14 do grupo estreptomina e dez do grupo ceftiofur (cinco por regime de tratamento) apresentaram cultivos de tecido renal negativo para crescimento de leptospirosas. Com relação ao exame sorológico houve presença de aglutininas anti leptospirosas em 13 sobreviventes ao tratamento com estreptomina e em cinco dos dez sobreviventes ao tratamento com o ceftiofur sódico dos quais, dois para o grupo tratado com uma única aplicação e três para o grupo tratado com duas aplicações do produto. Os dez hamsters do grupo controle do ambiente permaneceram vivos sem ter apresentado qualquer sinal clínico até a data prevista para o sacrifício e os resultados da cultura e sorologia foram negativos. Os cinco animais do grupo controle do inóculo infectante morreram por leptospirose a partir do quinto dia (pi); não foi processado o material de cultura e sorologia. Nos grupos controle da estreptomina e do ceftiofur sódico, a pesquisa sobre a toxicidade dos antibióticos baseou-se apenas na observação clínica dos animais no dia do sacrifício (21º dia p.i.); tiveram resultados negativos para a cultura e sorologia (Tabela 1). A comparação dos tempos de observação em dias (pi.) nos animais que morreram por leptospirose nos dois tratamentos efetuados com o ceftiofur e no grupo controle do inóculo revelou que as diferenças observadas foram destituídas de significado estatístico. (ANOVA: $p=0,2672$). A comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos aglutinantes apresentados pelos animais sobreviventes nos diferentes tratamentos apresentou diferenças não significativas (ANOVA: $p=0,0977$)

Tabela 1 - Hamsters infectados com *L. interrogans* sorovar pomona e tratados com antimicrobianos, primeira aplicação 48 horas após a infecção, segundo o tipo de antimicrobiano e esquema de administração, a evolução clínica e os resultados dos exames laboratoriais aplicados aos sobreviventes. São Paulo, 2000.

Tratamento (mg/kg)PV	Proporção* Mortos/ inoculados	Doentes e Evolução Clínica		Exames aplicados aos sobreviventes		
		Média dias(pi.) de observação	Mediana dias (pi) de observação	Cultura POS/RIM	SAM* Proporção reatores	SAM Título Anticorpos**
Estreptomicina uma aplicação (25mg/kg)	0/14	0/14	13/14	2,004
Ceftiofur Sódico uma aplicação (20mg/kg)	10/15	5,3	5,0	0/5	2/5	0,921
Ceftiofur Sódico duas aplicações (20mg/kg)	10/15	6,0	6,0	0/5	3/5	1,442
Controle inóculo infectante	5/5	5,6	5,0
Controle estreptomicina	0/5	0/5	0/5	...
Controle ceftiofur sódico	0/4	0/5	0/5	...
Controle ambiente	0/10	0/10	0/10	...

*número mortos/ número de infectados; PV- Peso Vivo; ... Dado não disponível; (pi.) = pós infecção com leptospirose. SAM= soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose; ** Média geométrica.

Segunda etapa: Nos animais dos grupos tratados com o ceftiofur sódico nas concentrações de 30 mg/kg de peso vivo, aplicação única, não houve qualquer evidência clínica de leptospirose, todos sobreviveram a infecção e foram sacrificados no 30º dia (pi.). Não foi feita a pesquisa de toxicidade do produto em função da dose utilizada. O mesmo ocorreu para o grupo tratado com ceftiofur sódico na concentração de 40mg/kg de peso vivo. Dos 24 sobreviventes, 23 apresentaram aglutininas para o sorovar pomona em títulos com médias geométricas de 3,062 e 2,937 respectivamente para as concentrações de 30 e 40 mg de ceftiofur sódico/kg/PV. Com relação aos grupos controles das doses de 30 e 40mg de ceftiofur sódico e o controle do ambiente, todos sobreviveram até o 30º dia, nenhum animal apresentou sintomas de leptospirose; no exame sorológico não foram revelados anticorpos anti leptospirose e não houve crescimento de leptospirose nos cultivos de tecido renal efetuados em meio de Fletcher. Todos os animais do grupo controle do inóculo infectante morreram por leptospirose no quinto dia após a infecção. A comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos aglutinantes apresentados pelos animais sobreviventes nos diferentes tratamentos revelou que as diferenças observadas foram não significantes (Teste Mann-Whitney; p=0,6297 - Tabela 2).

Terceira etapa: Os grupos que serviram como controle do inóculo infectante apresentaram 100% de mortalidade por leptospirose. A evolução da infecção foi proporcional à concentração do inóculo, os tempos de observação em dias (pi.) variaram de 4 a 10 dias respectivamente nos grupos infectados com maior e

menor concentração de leptospirose. As diferenças observadas apresentaram significado estatístico (ANOVA, p< 0,0001- Tabela 3).

Dos hamsters inoculados e tratados com uma única dose de ceftiofur sódico na concentração de 25mg/kg de peso vivo (grupos de 1 a 5), não houve nenhuma morte. O exame sorológico demonstrou reação de aglutinação positiva em 47 dos 50 animais tratados com ceftiofur sódico. Foram isoladas leptospirose no cultivo do tecido renal em dois dos 50 animais. As diferenças observadas nas médias geométricas dos títulos de anticorpos aglutinantes anti-leptospirose nos animais sobreviventes foram destituídas de significado estatístico (Kruskal-Wallis, p: 0,3417 - Tabela 3).

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 revelam que o tratamento com uma única aplicação de estreptomicina na dose de 25mg/kg de peso vivo, foi capaz de deter a evolução da infecção e a colonização renal em todos os animais inoculados com *L. interrogans* sorovar pomona o que inclusive é um resultado superior ao obtido por STALHEIM (1966b) que utilizou três aplicações em dias sucessivos; no entanto, para o ceftiofur sódico, a dose de 20mg/kg de peso vivo não sustentou a evolução da infecção em 20 dos 30 hamsters inoculados (66,66%), tanto no regime de uma como em duas aplicações, de fato ALT & BOLIN (1996) obtiveram sucesso com esta concentração da cefalosporina em regimes de três a cinco aplicações. Saliente-se, contudo que, os dez sobreviventes deste

Tabela 2 - Hamsters infectados com *L. interrogans* sorovar pomona e tratados com ceftiofur sódico, uma única aplicação 48 horas após a infecção, segundo a concentração do antimicrobiano (30 e 40mg/kg/pv), a evolução clínica e os resultados dos exames laboratoriais aplicados aos sobreviventes. São Paulo, 2000.

Tratamento (mg/kg)PV	Proporção* Mortos/ inoculados	Doentes e Evolução Clínica		Exames aplicados aos sobreviventes		
		Média dias(pi.) de observação	Mediana dias (pi) de observação	Cultura POS/RIM	SAM* Proporção reatores	SAM Título Anticorpos**
Ceftiofur Sódico uma aplicação (30mg/kg)	0/12	0/12	12/12	3,062
Ceftiofur Sódico uma aplicação (40mg/kg)	0/12	1/12	11/12	2,937
Controle inóculo infectante	4/4	5,0	5,0
Controle ceftiofur sódico (30mg/kg)	0/5	0/5	0/5	...
Controle ceftiofur sódico (40mg/kg)	0/5	0/5	0/5	...
Controle ambiente	0/2	0/2	0/2	...

*número mortos/ número de infectados; PV- Peso Vivo; ... Dado não disponível; (pi.) = pós infecção com leptospiros. SAM= soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose; ** Média geométrica.

Tabela 3 - Hamsters infectados com *L. interrogans* sorovar pomona e tratados com ceftiofur sódico na concentração de 25 mg/kg/pv, uma única aplicação 48 horas após a infecção segundo a diluição do inóculo infectante, a evolução clínica e os resultados dos exames laboratoriais aplicados aos sobreviventes. São Paulo, 2000.

Diluição do inóculo de <i>L. interrogans</i> sorovar pomona	Controle do inóculo infectante			Grupo tratado com o ceftiofur sódico 25 mg/kg/PV dose única			
	Proporção Mortos/ inoculados	Média dias (pi.) de observação	Mediana dias (pi.) de observação	Proporção Mortos/ inoculados	Cultivo pos/rim	SAM Proporção reatores	SAM Título Anticorpos**
10 ⁻¹	10/10	4,7	4,0	0/10	1/10	9/10	2,162
10 ⁻²	10/10	5,0	5,0	0/10	0/10	10/10	2,423
10 ⁻³	10/10	6,5	6,0	0/10	0/10	10/10	2,453
10 ⁻⁴	10/10	8,1	7,5	0/10	0/10	9/10	2,132
10 ⁻⁵	10/10	8,7	9,0	0/10	1/10	9/10	2,132
Total	50/50	6,6	6,0	0/50	2/50	47/50	2,260

* número mortos/ número de infectados; PV- Peso Vivo; (pi.)= pós infecção com leptospiros. SAM= soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose; ** Média geométrica.

tratamento apresentaram cultivos renais negativos o que indica a capacidade deste produto para impedir a colonização renal. O tempo de observação em dias (pi.) dos animais tratados com o ceftiofur sódico e que morreram por leptospirose foi idêntico ao verificado no grupo controle do inóculo infectante o que demonstra a ausência de interferência do tratamento efetuado sobre a evolução da infecção dos animais. Dentre os 10 sobreviventes, tratados com o ceftiofur sódico, a confirmação sorológica da infecção foi efetivada em cinco indivíduos e é provável que os níveis de aglutininas dos outros animais estivesse abaixo do ponto de corte adotado para o teste de SAM, diluição de 1:100. Nos grupos controles dos antibióticos e do ambiente não foi observada nenhuma alteração clínica.

Devido a alta proporção de animais mortos tratados com o ceftiofur sódico na concentração de 20mg/kg/peso vivo (Tabela 1), tanto em uma como em duas aplicações em dias sucessivos, decidiu-se pelo emprego de concentrações mais elevadas deste antimicrobiano, a despeito de ser ultrapassado o valor preconizado pelo fabricante: 2,2 mg./kg/PV (ALT & BOLIN, 1996)

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam que todos os hamsters submetidos ao tratamento com o ceftiofur sódico nas concentrações de 30 e 40mg/kg de peso vivo resistiram à infecção e não apresentaram os sinais clínicos da doença. Entretanto houve crescimento de leptospiros no cultivo renal, de um dos 12 animais (8,33%) trata-

dos com a concentração de 40mg/kg de peso vivo e sacrificado, em ausência de sinais clínicos, no 30º dia da infecção experimental, o que indica que esta dose não ofereceu proteção completa contra a leptospirose e suscita a hipótese da interferência de fatores de resistência orgânica individual. Todos os animais do grupo controle do inóculo infectante morreram por leptospirose no quinto dia (pi.) o que confirma a virulência do inóculo empregado. No 30º dia (pi.), foi constatada a presença de aglutininas anti-leptospira em 23 dos 24 animais que resistiram a infecção (95,83%). Do exposto depreende-se que uma única aplicação das concentrações de 30 e 40 mg de ceftiofur sódico/kg de peso vivo, foi capaz de sustar a evolução da infecção e, a despeito destes valores terem sido muito superiores à recomendação do fabricante (ALT & BOLIN, 1996) nenhum dos animais dos grupos controle do antimicrobiano apresentou qualquer alteração clínica durante o período de observação adotado, o que sugere a ausência de efeitos tóxicos devido as concentrações adotadas.

Com a constatação de ausência de efeito curativo no grupo tratado com a concentração de 20 mg/kg/PV no grupo tratado com o ceftiofur sódico, uma ou duas aplicações (Tabela 1) e o sucesso do tratamento empregado nos grupos tratados com 30 ou 40 mg/kg/PV, deste produto, optou-se pela realização de um novo ensaio avaliando-se o comportamento de uma única aplicação desta cefalosporina, na concentração de 25 mg/kg/PV (Tabela 3).

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram que a despeito de terem sido utilizadas concentrações decrescentes do inóculo infectante, todos os animais do grupo não tratado morreram por leptospirose. ALEXANDER & RULE (1987) só obtiveram sobreviventes no controle do inóculo infectante do sorovar bataviae em diluições superiores a 10^{-8} . No presente experimento foi constatado que a duração do período observação (pi) dos animais que morreram por leptospirose foi proporcional à redução da concentração do inóculo infectante. Para o grupo de animais tratado com o ceftiofur sódico, uma única aplicação de 25 mg/kg/PV, todos resistiram a infecção e em 47 dos 50 sobreviventes houve a constatação de aglutininas anti-leptospira no 21º dia (pi).

Os resultados apresentados na Tabela 3 revelam que o tratamento com uma única aplicação do ceftiofur sódico, na dose de 25mg/kg de peso vivo foi capaz de deter a manifestação clínica da leptospirose e a leptospirose, respectivamente em 100 e 96% dos casos. A despeito da estirpe infectante utilizada no presente experimento ter sido distinta da empregada por ALT & BOLIN (1996) pode-se aventar que uma pequena diferença na concentração do antimicrobiano (5 mg/kg/PV) foi capaz de modificar a ação terapêu-

tica do mesmo, pois na dose de 20mg/kg de peso vivo ALT & BOLIN (1996), só obtiveram bons resultados em regimes três a cinco dias de tratamento

A despeito da concentração do ceftiofur sódico utilizada no presente experimento ter sido cerca de 11 vezes superior a recomendada pelo fabricante (ALT & BOLIN, 1996) os resultados obtidos indicam a realização de maiores estudos sobre o comportamento desta cefalosporina com vistas ao encontro de uma alternativa para o uso da estreptomicina na quimioterapia da leptospirose animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, A .D. & RULE, P. EVALUATION OF PENICILINS, CEPHALOSPORINS, TETRACYCLINES AND ERYTHROMYCIN IN treatment of experimental leptospirosis in adult hamsters. *Isr. J. Vet. Med.*, v.43, n.4, p.296-306, 1987.
- ALT, D. P & BOLIN, C.A Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar pomona infection in hamsters and swine. *Am. J. Vet. Res.*, v.57, n.1, p.59-62, 1996.
- BECONI-BARKER, M.G.; DAVISON, K.L.; HORNISH, R. E.; ARNOLD, T.S.; CRAIGMILL, A.L.; GILBERTSON, T.J.; SMITH, E.B.; VIDMAR, T.J.; HOFFMAN, G. A.; GATCHELL, C. L. Ceftiofur Sodium Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion in Sheep Following Intramuscular Injections. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 43, n. 6, p. 1589-1597, 1994.
- BOOTH, N. H. & Mc DONALD, L.E. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 997p.
- CACCHIONE, R.A.; CASCELLI, E.S.; MARTINEZ, E.S. Leptospirosis experimental; empleo de antibioticos en el tratamiento de la enfermedad. *Rev. Invest. Agropecu.*, Sér. 4, Patol. Anim., v. 6, n. 12, p. 121-127. 1969.
- CAMARGO, C. R. A; VASCONCELLOS, S. A; NÜRMBERGER JÚNIOR, R.; PASSOS, E. C.; MORAIS, Z. M; VISINTIN, J. A. Investigação sobre a presença de leptospirosas em ovários de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 30. n. 2. p. 129-135, 1993.
- GALTON, M.M; SULZER, C. R; SANTA ROSA, C. A; FIELDS, M. J. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Appl. Microbiol.*, v. 13, p.81 - 85, 1965.
- GERRITSEN, M.J.; KOOPMANS, M.J.; DEKKER, T.C.E.M.; DEJONG, M.C.M. Effective treatment with dihydrostreptomycin of naturally infected cows shedding *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis, *Am. J. Vet. Res.*, v.55, p.339-343, 1994.
- GUIMARÃES, M.A; CÔRTEZ, J.A; VASCONCELLOS, S.A; ITO, F.H. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e seu controle terapêutico. *Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v.6/7, n. ¼, p.21-34, 1982/83.
- JONES, M.L. *Farmacologia y terapeutica veterinarias*. Mexico: Hispano Americana, 1969.
- SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico Laboratorial das Leptospiroses *Rev. Microbiol.*, v.1, n. 2, p. 97 -109, 1970.

- STALHEIM, O .H.V. Effects of antimicrobial agents on leptospiral growth, respiration, motility and viability. *Am. J. Vet. Res.*, v.27, n.118, p.797-802, 1966a.
- STALHEIM, O .H.V. Chemotherapy of renal leptospirosis in hamsters, *Am. J. Vet. Res.*, v.27, p.803-807, 1966b.
- STALHEIM, O.H.V. Chemotherapy of Renal Leptospirosis In Cattle, *Am. J. Vet. Res.*, v. 30, n. 8, p.1317-1323, 1969.
- STALHEIM, O .H.V. Chemotherapy of renal leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.160, p.89, 1972.
- STALHEIM, O. H.V. Quimioterapia e imunización para el control de la leptospirosis en los animales domesticos. In: REUNIÃO INTERAMERICANA SOBRE EL CONTROL DE LA FIEBRE AFTOSA Y OTRAS ZOONOSIS, 8., OMS: Guatemala, 1975. p.169-180. (Publicación científica, 316)
- WARREN, G.H. & WILSON, B.B. In vitro studies on the action of streptomycin upon five serotypes of *Leptospira* grown in two types of medium. *Am. J. Vet. Res.*, v.16, p.251-254, 1955.

Recebido para publicação em 16/10/00