

Vanderson Barcelos Rangel

RESISTÊNCIA DE *Haemonchus placei* (PLACE, 1893), *Cooperia punctata* (von LINSTOW, 1907) E *Oesophagostomum radiatum* (RUDOLPHI, 1803) ÀS AVERMECTINAS EM BOVINOS, EM PROPRIEDADE RURAL DE MINAS GERAIS.

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientador: José Oswaldo Costa

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2008

Dedicada aos animais que foram sacrificados para a realização desta obra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço todos aqueles que se me ajudaram a construir o conhecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL	15
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	15
2. LITERATURA CONSULTADA	15
2.1 PREVALÊNCIA DE HELMINTOS	15
2.2 LACTONAS MACROCÍCLICAS	16
2.2.1 Ivermectina	16
2.2.2 Abamectina	18
2.2.3 Doramectina	18
2.2.4 Formulações farmacêuticas	19
2.2.5 Toxicidade	21
2.2.6 Eficácia e Persistência	22
2.3 MERCADO FARMACÊUTICO VETERINÁRIO.....	25
2.4 RESISTÊNCIA	28
2.4.1 Mecanismos de resistência anti-helmíntica	28
2.4.2 Métodos de detecção da resistência.....	31
2.4.3 Resistência aos anti-helmínticos em bovinos	32
2.4.3.1 Relatos Internacionais.....	34
2.4.3.2 Relatos Nacionais	39
2.5 INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO ARTIFICIAL SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 PERÍODO EXPERIMENTAL	45
3.2 OBTENÇÃO DO INÓCULO	45
3.2.1 Local	45
3.2.2 Animais utilizados.....	45
3.2.3 Instalações e manejo	45
3.2.4 Destino das fezes excedentes	46
3.2.5 Seleção dos isolados e preparo do inóculo	46
3.2.6 Ampliação do inóculo	46
3.3 INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO ARTIFICIAL SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	46
3.3.1 Local	47
3.3.2 Animais utilizados.....	47
3.3.3 Instalações e manejo	47
3.3.4 Destino das fezes excedentes	47
3.3.5 Preparo dos animais e coleta.....	47
3.3.6 Análise estatística dos dados.....	47
3.4 TESTE CONTROLADO	48
3.4.1 Local	48
3.4.2 Animais utilizados.....	48
3.4.3 Instalações e manejo	48
3.4.4 Destino das fezes excedentes	48
3.4.5 Preparo dos animais e tratamentos	48
3.4.6 Cálculo da eficácia e análise dos dados	50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 TESTE DE REDUÇÃO DE OPG.....	51
4.2 INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO ARTIFICIAL SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	52
4.3 TESTE CONTROLADO	55
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Faturamento (R\$) e crescimento (%) do mercado farmacêutico veterinário. Brasil, 1997 – 2006	25
Tabela 2 – Faturamento (R\$) e variação (%) do mercado farmacêutico veterinário por espécie animal. Brasil, 2002 – 2006	26
Tabela 3 – Rebanho bovino. Brasil, 1997 – 2005	26
Tabela 4 – Faturamento (R\$) e variação (%) do mercado farmacêutico veterinário por grupos de antiparasitários. Brasil, 2002 – 2006.....	27
Tabela 5 – Tratamentos realizados, doses utilizadas e número de animais utilizados por grupo experimental, avaliações com necropsias realizadas 14 e 28 dias após tratamento em bezerros experimentalmente infectados com helmintos gastrintestinais. Vitória – ES, 2007.....	49
Tabela 6 – Média e porcentagem de redução da contagem de ovos nas fezes de bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, tratados com avermectinas e avaliados no dia 0 e 14 dias pós-tratamento. Vitória - ES, 2007	51
Tabela 7 – Média e porcentagem de redução da contagem de ovos nas fezes de bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, tratados com avermectinas e avaliados no dia 0 e 28 dias pós-tratamento. Vitória - ES, 2007	52
Tabela 8 – Média aritmética, desvio padrão, amplitude (entre parêntesis) e padrões de referência das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), leucócitos totais, monócitos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos segmentados e neutrófilos bastonetes; de observações realizadas antes e após infecção com helmintos resistentes, em bovinos mestiços. Vitória – ES, 2007	53
Tabela 9 – Média aritmética, desvio padrão e amplitude (entre parêntesis) das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), volume globular e proteínas plasmáticas; de observações realizadas antes e após infecção com helmintos resistentes, em bovinos mestiços. Vitória – ES, 2007.....	54
Tabela 10 – Média aritmética e porcentagem de redução das contagens de nematóides de bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, tratados com avermectinas e avaliados 14 dias pós-tratamento. Vitória - ES, 2007	56

Tabela 11 – Média e porcentagem de redução das contagens de nematóides de bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, tratados com avermectinas e avaliados 28 dias pós-tratamento. Vitória – ES, 2007	56
Tabela 12 – Porcentagem de redução de OPG, utilizando media aritmética, de tratamentos endectocidas em bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, avaliada 14 e 28 dias pós-tratamento. Vitória – ES, 2007.....	57
Tabela 13 – Porcentagem de redução de OPG, utilizando media geométrica, de tratamentos endectocidas em bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, avaliada 14 e 28 dias pós-tratamento. Vitória – ES, 2007.....	57
Tabela 14 – Médias aritméticas das contagens de nematóides de bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, tratados com avermectinas e avaliados 14 e 28 dias pós-tratamento. Vitória – ES, 2007	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da avermectina B ₁ , avermectina B ₂ e 22,23-dihidroavermectina B ₁ (Shoop e Soll, 2002).....	18
Figura 2 – Estrutura química da doramectina (Conder e Baker, 2002)	19

LISTA DE ANEXOS

Anexo I – Figura 3 - Participação das espécies animais no faturamento do mercado farmacêutico veterinário, Brasil, 2007. Adaptado de Sindan, 2007a	69
Anexo II – Figura 4 - Participação das classes terapêuticas no faturamento do mercado farmacêutico veterinário, Brasil, 2007. Adaptado de Sindan, 2007a	71
Anexo III – Figura 5 - Participação das classes terapêuticas no faturamento de antiparasitários do mercado farmacêutico veterinário, Brasil, 2007. Adaptado de Sindan, 2007a	73
Anexo IV – Valores individuais das contagens de leucócitos totais (mil/ μ L), monócitos (μ L), linfócitos (μ L), eosinófilos (μ L), neutrófilos segmentados (μ L) e neutrófilos bastonetes (μ L), média aritmética e desvio padrão, em bovinos mestiços infectados artificialmente com larvas de helmintos, avaliados no dia da infecção (dia 0). Vitória – ES, 2007	75
Anexo V – Valores individuais das contagens de leucócitos totais (mil/ μ L), monócitos (μ L), linfócitos (μ L), eosinófilos (μ L), neutrófilos segmentados (μ L) e neutrófilos bastonetes (μ L), média aritmética e desvio padrão, em bovinos mestiços infectados artificialmente com larvas de helmintos, avaliados no dia 46 pós-infecção. Vitória – ES, 2007.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC	Área sob a curva
C _{max}	Concentração máxima da droga
Enzimas	
	ALT/GPT..	Alanina transaminase
	AP.....	Fosfatase alcalina
	AST/GOT..	Aminotransferase – aspartatotransaminase
	CK/CPK....	Creatinina quinase
	GGT.....	Gama glutamil transpeptidase
	LDH.....	Lactato desidrogenase
FECRT	Teste de redução de OPG
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GluCl α	Canal alfa de cloro aberto pelo glutamato
L3	Larvas de terceiro estágio
LT	Leucócitos totais
MRT	Tempo médio residual
mL	Mililitros
OPG	Ovos por grama de fezes
pH	Potencial hidrogeniônico
p.i.	Pós-infecção
PP	Proteína plasmática
p.t.	Pós-tratamento
RF	Fator de resistência
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TEO	Teste de eclosão de ovos de helmintos
T _{max}	Tempo de concentração plasmática máxima da droga
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UVV	Centro Universitário Vila Velha
VG	Volume globular
WAAVP	World Association for Advancement the Veterinary Parasitology

RESUMO

Utilizando teste controlado com infecção artificial, quarenta e oito bezerros livres de helmintos foram infectados individualmente com 11.000 L3 de *Cooperia* sp., 11.000 L3 de *Haemonchus* sp. e 48.000 L3 *Oesophagostomum* sp. Foram formados grupos com 12 animais cada: grupo sem tratamento T1 controle, grupo T2 tratado com Dectomax 1%, grupo T3 tratado com ivermectina 3,15% e grupo T4 tratado com uma associação de ivermectina 2,25% mais abamectina 1,25%. No dia da infecção e 46 depois, foram avaliados os parâmetros hematológicos. Para avaliar a persistência da eficácia, seis animais de cada grupo foram necropsiados 14 dias após os tratamentos, o restante dos animais foi necropsiado 28 dias após os tratamentos, para a realização das contagens de helmintos. Não houve alteração das células da série branca entre as observações, exceto eosinófilos e neutrófilos segmentados que sofreram ligeira queda nos valores, mas se mantendo dentro dos limites de normalidade. No dia 46 o volume globular médio e a proteína plasmática média apresentaram valores abaixo do limite inferior de normalidade e queda significativa em suas contagens entre observações. A eficácia 14 dias após o tratamento, utilizando a média aritmética das contagens de helmintos, foi de T2 – 80%, 66% e 39%; T3 – 40%, 18% e 52%; e T4 – 74%, 97% e 95%, para *H. placei*, *C. punctata* e *O. radiatum*. A eficácia calculada 28 dias após o tratamento foi de T2 – 18%, 25% e 0%; T3 – 0%, 52% e 0%; e T4 – 89%, 98% e 86%. Dessa maneira, *Haemonchus placei* foi identificado como resistente aos fármacos estudados. *C. punctata* e *O. radiatum* foram identificados como resistentes à doramectina 1%, ivermectina 3,15% e sensíveis à associação de avermectinas.

Palavras chave: Teste controlado, resistência anti-helmíntica, avermectinas, parâmetros hematológicos e bovinos.

ABSTRACT

Using controlled test with artificial infection. Forty-eight calves helminth free were infected individually with 11,000 L3 of *Cooperia* sp., 11,000 of L3 *Haemonchus* sp. and 48,000 L3 of *Oesophagostomum* sp. Groups were formed with 12 animals each: T1 - control group, T2 - group treated with Dectomax 1%, T3 - group treated with ivermectin 3.15% and T4 - group treated with a combination of ivermectin 2.25% plus abamectin 1.25%. On the infection day and 46 days after it, haematological parameter were evaluated. To evaluate the effectiveness persistence, six animals from each group were necropsied 14 days after the treatments, the rest of the animals were necropsied 28 days after the treatments in order to have the helminth counts. There was no change in total leukocytes, monocyte, lymphocytes and band neutrophils between evaluations. Eosinophils and segmented neutrophils suffered slight decrease in values with statistical difference, but within the bounds of normality. On 46th day the globular average and the average plasma figures below the lower limit of normality and showed significant decrease during the experiment. In controlled test the effectiveness 14 days after treatment, calculated using the arithmetic mean of helminth counts were T2 - 80%, 66% and 39%, T3 - 40%, 18% and 52% and T4 - 74% , 97% and 95% for *Haemonchus placei*, *Cooperia punctata* and *Oesophagostomum radiatum*. The effectiveness calculated 28 days after the treatment was T2 - 18%, 25% and 0%; T3 - 0%, 52% and 0% and T4 - 89%, 98% and 86%. Thus, isolated from *Haemonchus placei* were identified as resistant to drugs in this experiment. Isolated from *Cooperia punctata* and *Oesophagostomum radiatum* were identified as resistant to doramectin 1%, ivermectin 3.15% and sensitive to the association of ivermectin 2.25% 1.25% plus abamectin.

Key words: controlled test, antihelminthic resistance, avermectins, haematological parameters and cattle.

1.INTRODUÇÃO

As parasitoses gastrintestinais estão amplamente disseminadas na pecuária, prejudicando o desempenho dos bovinos, competindo pela absorção de alimentos e espoliando o hospedeiro. Diferentemente dos ectoparasitos, os vermes não são visualizados diretamente pelo produtor o que dificulta o diagnóstico e a avaliação da carga parasitária pelo leigo. Dessa maneira, o tratamento muitas vezes é feito erroneamente, baseado no aspecto geral do animal e em informações não científicas. Além disso, a infecção helmíntica se apresenta de forma crônica e com mortalidade baixa, contribuindo para o baixo índice de crescimento dos animais, fato observado por Bianchin e Melo (1993), nas criações extensivas de bovinos de corte, no Brasil central. Entre os helmintos gastrintestinais o filo Nematoda é o que possui o maior número de espécies que parasitam bovinos. Contudo, levantamentos feitos em diferentes regiões do Brasil mostraram que as espécies mais comuns são as pertencentes aos gêneros *Cooperia* e *Haemonchus* (Carneiro e Freitas, 1977; Melo e Bianchin, 1977; Leite *et al.*, 1981; Honer e Bressan, 1992; Souza *et al.*, 2002). Apesar de ter menor prevalência, o gênero *Oesophagostomum* sp. é comumente encontrado (Santos, 1973; Bianchin, 1991 e Lima, 1995).

O controle dos helmintos tem sido realizado utilizando principalmente produtos químicos. Os fármacos principais, disponíveis no mercado para bovinocultura, pertencem à três bases químicas: imidazotiazóis, benzimidazóis e lactonas macrocíclicas. Os dois primeiros grupos são estritamente vermífugos, enquanto o grupo das lactonas macrocíclicas agrupa substâncias chamadas de endectocidas, pelo fato de serem eficazes contra os parasitos externos e internos. No Brasil, o segmento de endectocidas é um dos mais importantes no mercado farmacêutico veterinário. (Sindan, 2007a).

Dentro do grupo das lactonas macrocíclicas, o subgrupo químico das avermectinas é o

que mais tem produtos comerciais para todas as espécies animais. Pertencem a este subgrupo basicamente quatro bases farmacológicas utilizadas em bovinos: ivermectina, abamectina, doramectina e eprinomectina. No Brasil, a ivermectina foi introduzida de forma precursora no mercado de antiparasitocidas em 1981 e a abamectina introduzida em 1985, ambas com potente ação anti-helmíntica e auxiliar no controle de ácaros Ixodídeos. Naquela época acreditava-se que as avermectinas eram a solução dos problemas no controle parasitário ou, no mínimo, uma melhor alternativa para os controle de parasitos então resistentes aos benzimidazóis. Passados dez anos do lançamento da primeira molécula de avermectina no Brasil, a patente sobre alguns tipos de bases expirou, decorrendo no aparecimento de várias marcas diferentes de avermectinas, principalmente de ivermectina (Eddi *et al*, 2002).

Hoje temos no país mais de 50 marcas comerciais de diferentes laboratórios (Sindan, 2007b), não existindo por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento uma fiscalização ou controle continuado da qualidade e concentração dos produtos comercializados, ficando a cargo de cada fabricante a garantia dos parâmetros da formulação. Além disso, após 25 anos dessas formulações disponíveis no mercado, e devido à alta oferta de produtos de baixo custo, vem ocorrendo a utilização indiscriminada.

Segundo Eddi *et al* (2002), o que tem se mostrado de mais difícil implementação nos países pobres é o monitoramento contínuo da qualidade dos agentes antiparasitocidas com o objetivo de prevenir abusos, adulteração, venda de preparados de baixo padrão e combinação de drogas de estabilidade duvidosa.

Echevarria (2002) afirma que a grande variedade de marcas comerciais, associadas às campanhas eficientes de marketing e à diminuição relativa dos preços dos produtos tem levado a um uso intenso e indiscriminado de anti-helmínticos nos

rebanhos. Esta forte pressão de seleção, com conseqüente aumento da prevalência da resistência, tem feito com que a exploração de algumas espécies animais, p.ex. a ovina, corra risco de falta de sustentabilidade, como está ocorrendo pela falta de opções em medicamentos eficientes para o controle do *Haemonchus* na África do Sul e no Paraguai.

Com o uso intensivo de anti-helmínticos com intervalos entre tratamentos se aproximando do período pré-patente dos nematóides, os parasitos resistentes são capazes de continuar ininterruptamente a reprodução no hospedeiro, enquanto os sensíveis terão poucas oportunidades de infectar os animais, alcançar maturidade e produzir ovos antes de serem expostos ao próximo tratamento. Este tipo de manejo, influenciando o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica ao albendazole, ao levamisole e a ivermectina foi demonstrado por Souza *et al.* (2002).

Corroborando com esses fatos, Taylor *et al.* (2002) afirmam que o intensivo uso de anti-helmínticos para o controle de infecções desses parasitos na pecuária tem resultado no desenvolvimento de resistência, e este se tornou o maior problema prático da criação de animais em vários países. Assim, a euforia e a boa performance inicial das avermectinas foram paulatinamente cedendo lugar a resultados mais modestos, devido à diminuição da eficácia dos produtos.

Como conseqüência, a resistência dos helmintos em bovinos aos fármacos é relatada por vários autores no Brasil (Paiva *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2004, Rangel *et al.*, 2005).

Existem diferentes métodos para se verificar a resistência dos helmintos às bases farmacológicas. Segundo as recomendações da World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) (Coles *et al.*, 1992 e Wood *et al.*, 1995), isolados de helmintos testados para resistência através do teste de redução de ovos por grama de fezes (FECRT) podem ter sua condição de sensibilidade ao

fármaco confirmada por um método de diagnóstico confiável, como o teste controlado. Este teste envolve infecção artificial de larvas de terceiro estágio de helmintos, tratamento e necropsia. Segundo Wood *et al.* (1995), o intervalo entre o tratamento e as necropsias deve ser de acordo com a farmacologia dos produtos testados. Contudo, são raras as avaliações de produtos de ação ultraprolongada utilizando o teste controlado. Além disso, o número de larvas utilizadas varia de acordo com a patogenicidade e o estabelecimento de infecções satisfatórias do gênero utilizado. As recomendações em relação ao número máximo de formas infectantes (L3), para *Cooperia* sp., *Haemonchus* sp. e *Oesophagostomum* sp., são: 15.000 L3, 10.000 L3 e 2.500 L3, respectivamente. Quando se utilizam quantidades de L3 diferentes das recomendadas, podem ser utilizados os parâmetros hematológicos de bezerros para avaliar a viabilidade do protocolo, já que eles podem ser diretamente afetados pela infecção helmíntica e servir de parâmetro para avaliar a influência da carga parasitária no hospedeiro, (Bremner, 1970; O'Kelly, 1980 e Sciavico, 1996).

Em um rebanho bovino de corte da raça Canchim, foram realizados FECRT para avaliar a eficácia de anti-helmínticos à base de lactonas macrocíclicas. Nestes testes realizados em 2002, foi observado uma baixa eficácia de ivermectina 1%, ivermectina LA 1%, e doramectina 1%. Entretanto, os resultados foram satisfatórios para moxidectina 1% e abamectina LA 1% (Rangel *et al.*, 2005). Seguindo os protocolos determinados pela W.A.A.V.P. (Coles *et al.*, 1992 e Wood *et al.*, 1995) esses helmintos, identificados pelo teste de redução de OPG, foram considerados suspeitos de serem resistentes as avermectinas.

Para confirmar essa suspeita de resistência, foram utilizadas fezes provenientes deste rebanho Canchim, onde foram realizados os FECRT em 2002, em Belo Horizonte – MG. Este material foi transferido para Vitória – ES e, além de realizado OPG, dele foram obtidas larvas de helmintos através de coprocultura. Essas larvas foram inoculadas

em bezerros estabulados e serviram para a ampliação da quantidade do material, que foi utilizado em teste controlado. Com quantidade apropriada de larvas, foi realizado teste controlado, com infecção artificial, em bezerros e avaliados os pontos propostos no objetivo desse trabalho.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia de produtos à base de avermectinas contra helmintos parasitas de bovinos suspeitos de resistência anti-helmíntica.

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Verificar a eficácia de três produtos comerciais endectocidas de ação prolongada contra helmintos suspeitos de resistência às avermectinas, utilizando teste controlado com infecção artificial, e avaliar as alterações nos parâmetros hematológicos de bezerros utilizados neste teste controlado.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1 PREVALÊNCIA DE HELMINTOS

Carneiro e Freitas (1977), analisando o curso natural das infestações de helmintos de bezerros nascidos em diferentes épocas do ano, perceberam que a intensidade de parasitismo foi baixa pelo fato dos animais serem de raças zebuínas e que aos 12 meses de idade não houve diferença entre os grupos, todos com baixíssima infestação. A coprocultura mostrou predominância do gênero *Cooperia*. O pico da contagem das larvas foi aos quatro, sete e aos 10 meses de idade. Após estas contagens o número de larvas sofreu queda brusca indicando o desenvolvimento de resistência adquirida pelo animal. Foi observado ainda que *Cooperia punctata* ocorreu mais que *Cooperia pectinata*. *Haemonchus* sp. foi detectado na cultura dos dois meses até os 12 meses, com pico entre o sétimo e nono mês.

Melo e Bianchin (1977) realizaram estudos epidemiológicos no cerrado de Mato

Grosso. Trabalhando durante um ano para cada período experimental, com grupos vermifugados com tetramisol e grupos controle. Foi observada a prevalência das seguintes espécies: *Cooperia punctata* e *C. pectinata* 71%, *Haemonchus similis* e *H. contortus* 20%, *Trichostrongylus axei* 4%, *Oesophagostomum radiatum* 4%, *Bunostomum phlebotomum* 1%. As contagens de ovos por grama de fezes (OPG) dos grupos controle demonstraram um ápice em janeiro e fevereiro, e outro em setembro e outubro - meados e início da estação das chuvas, respectivamente. Segundo os autores, o aumento de OPG no início das chuvas se deve ao desenvolvimento e migração das larvas infestantes que estavam presentes nas pastagens; e o aumento no meio da estação se deve ao grande número de ingestão de larvas na pastagem nos meses outubro, novembro e dezembro. Essas larvas foram provenientes dos ovos das fezes dos animais adultos no início da estação e por bezerros nascidos em agosto e setembro. Foi observado ainda que os animais possuíam alto grau de vermes adultos na estação seca. Contudo, os animais traçadores demonstraram que a presença de larvas nas pastagens neste período é mínima. Essa relação inversa provavelmente se deve ao desenvolvimento das formas com desenvolvimento interrompido ou hipobióticas, presentes no começo da seca. Os autores concluíram que no período da seca a verminose torna-se mais grave pois, sendo as populações de larvas nas pastagens mínimas na seca e altas nas águas, o achado de uma alta população de vermes adultos na seca indica que devemos tratar neste período, somando-se a isso a baixa oferta de capim de qualidade e a baixa taxa de reinfecção pelos animais.

Corroborando com trabalho anterior, Honer e Bressan (1992) afirmam que no Brasil, nas regiões de verão úmido e inverno ameno, as larvas se desenvolvem e se acumulam durante a estação chuvosa. Nos meses secos, o número de larvas nas pastagens diminui gradativamente por causa da dessecação. Portanto, a maioria da população de vermes nos meses mais

secos está abrigada nos animais. O mesmo ocorre nas regiões de inverno rigoroso, nas épocas frias a temperatura desce abaixo do ideal para desenvolvimento dos ovos e larvas, diminuindo, portanto, a infecção das pastagens. Deste modo propõe-se, para o Brasil Central, que o controle se intensifique durante os meses secos.

Leite *et al* (1981), estudando o curso natural das infecções de helmintos gastrintestinais, observaram que houve um aumento do OPG até os 4 meses de idade, após este período houve uma queda na contagem de ovos, provavelmente devido à imunidade adquirida do animal. Foi observado ainda que a infecção pelo gênero *Cooperia* foi maior durante todo o experimento, exceto nos meses de agosto e setembro, e a infecção por *Oesophagostomum* sp. foi baixa e inconstante, possivelmente devido à idade dos bezerros já que a infecção desse gênero ocorre em níveis máximos aos 12–16 meses de idade. A infecção foi diretamente influenciada pela precipitação pluvial. Ainda foram encontradas as seguintes espécies: *Cooperia punctata*, *Haemonchus contortus*, *H. similis*, *Trichostrongylus axei*, *Oesophagostomum radiatum*, *Bunostomum phlebotomum*, e *Trichuris discolor*.

Estudando a prevalência dos gêneros de helmintos, Bianchin (1991) realizando trabalhos entre 1987 a 1989, no Mato Grosso do Sul, observou que 75,8% eram *Cooperia* sp., 14,4% *Haemoncus* sp., 6,8% *Trichostrongylus axei*, 2,6% *Oesophagostomum radiatum* e 0,4% outros gêneros.

2.2 LACTONAS MACROCÍCLICAS.

As lactonas macrocíclicas incluem o grupo de compostos macrocíclicos formados por uma extensão de cadeia de múltiplos propionatos e ciclizados a uma lactona grande, tipicamente de 12, 14 e 16 membros. São freqüentemente glicosilados. O grupo de antibióticos Macrolídeos faz parte das lactonas macrocíclicas. Como exemplo pode-se citar a eritromicina, um antibiótico macrolídeo descoberto em 1952 como um metabólito do microrganismo

Streptomyces erythreus (Kapusnik-Uner, 1996).

A avermectina e a milbemicina também são grupos de derivados macrocíclicos da lactona de 16 membros que, diferente dos antibióticos macrolídeos, não tem atividade antifúngica ou antibacteriana (Roberson, 1992; Jung *et al*, 2002).

Esses dois grupos diferem principalmente em um grupo dissacarídeo ligado ao Carbono-13 presente na avermectina, mas não nas milbemicinas. As milbemicinas, descobertas em 1967, são produzidas pela fermentação de actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Dois compostos desta classe são importantes comercialmente como vermífugos. A milbemicina oxima, sintetizada a partir da fermentação de *Streptomyces hygroscopius* subsep. *aureolocrimosus*, é utilizada principalmente em cães e gatos. O outro composto é a moxidectina, sintetizada a partir da nemadectina e utilizada como endectocida em animais de produção. A nemadectina foi descoberta em 1983, e é produto da fermentação de *Streptomyces hygroscopius* subsep. *noncyanogenus* (Hennessy e Alvinere, 2002; Jung *et al*, 2002; Rock *et al*, 2002).

Os compostos do grupo das avermectinas derivam da fermentação de *Streptomyces avermitilis*. Os compostos deste grupo comercializados como endectocidas são a abamectina, ivermectina, eprinomectina, doramectina e selamectina. Este último é um derivado semi-sintético da doramectina, e é utilizado estritamente em cães e gatos (Hennessy e Alvinere, 2002).

2.2.1 Ivermectina

O microrganismo que produz a ivermectina foi isolado do solo perto de um campo de golfe em Kawana, Cidade de Ito, Shizuoka, Japão. Esse trabalho foi realizado pelo Instituto Kitasato, sob a chefia do Dr. Satoshi Ōmura, e fazia parte de um projeto de pesquisa em parceria com Merck Sharp & Dohme Research Laboratories - atualmente Merial Limited® - firmada em

1973. Essas culturas, isoladas em 1974, foram enviadas para multinacional e passaram pelos programas de seleção de drogas - *screening* - da companhia, utilizando um modelo experimental de camundongos infectados com o nematóide gastrointestinal *Nematospiroides dubius*. A cepa produtora de avermectinas foi apenas uma das 50 culturas selecionadas pelo Instituto Kitasato para *screening*. O microrganismo foi classificado como gênero *Streptomyces* e a nova espécie recebeu o nome de *avermittilis*, devido à sua capacidade de produzir substância com atividade anti-helmíntica. Em 1979 foram publicados os primeiros trabalhos sobre a substância e em 1981 foi lançado o primeiro produto comercial à base de ivermectina, o Ivomec® (Egerton *et al*, 1979; Burg *et al*, 1979; Burg e Stapley, 1989; Ômura, 2007)

A fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermittilis* produz quatro pares homólogos de compostos estreitamente relacionados: A₁, A₂, B₁, B₂. Os compostos "A" têm um radical 5-metoxi, enquanto que os compostos "B" têm um 5-hidroxi substituinte; e os compostos "1" têm uma ligação dupla no Carbono-22,23 o que pode ser obtida pela desidratação do grupo axial 22-hidroxi presente nos compostos "2". Os quatro pares se subdividem em componentes maiores "a" - com uma cadeia lateral butil no carbono-25 - e componentes menores (normalmente presentes em quantidades de 1% a 20%) "b" - com um substituinte isopropil no carbono-25. Em resumo, a fermentação nos dá oito tipos de avermectina - A_{1a}, A_{1b}, A_{2a}, A_{2b}, B_{1a}, B_{1b}, B_{2a} e B_{2b}. A avermectina B_{1a} é a mais importante por causa de sua alta potência contra um grande espectro de parasitas, de animais e humanos, e pestes da agricultura. Essa potência é em grande parte devido à presença do substituinte 5-hidroxi e do agrupamento de dissacarídeo. A avermectina B_{1a}, também é chamada de abamectina, serve de material inicial para análogo semi-sintético 22,23-dihidro, o qual

é utilizado quase exclusivamente com o nome de ivermectina. A estrutura química da ivermectina se assemelha à B₂, exceto pela falta do grupo axial hidroxila no C-23, presente na B₂. A ivermectina é obtida pela saturação seletiva da ligação dupla C-22,23 e também pode ser chamada de 22,23-dihidroavermectina B₁. A separação, em larga escala, dos componentes "a" e "b" é impraticável e desnecessária, já que ambos homólogos têm atividade idêntica. Dessa forma, a referência à avermectina B₁ consiste em uma mistura com não menos de 90% de forma B_{1a} e não mais de 10% de B_{1b} (Fig. 1) (Fisher e Mrozik, 1989; Shoop e Soll, 2002; Ômura, 2007).

Inicialmente, as investigações sobre o mecanismo de ação da ivermectina se concentravam na habilidade da substância em abrir os canais de cloro abertos pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). GABA é conhecido como um neurotransmissor inibidor no sistema neuromuscular de nematóides. Posteriormente foi demonstrado no nematóide experimental *Caenorhabditis elegans* a importância dos canais de cloro abertos pelo glutamato (GluCl), deixando os canais abertos pelo GABA com menor importância na farmacologia da ivermectina. Embora a ivermectina paralise os músculos do corpo do verme, um efeito mais potente é observado no músculo faríngeo impedindo a alimentação. A rápida e alta exposição do parasito à droga após o tratamento paralisa o verme. Contudo, a eficácia persistente, com níveis mais baixos da droga, parece matar o parasito por inanição. Não era conhecido como a ivermectina alcançava o sistema nervoso central (SNC) de mamíferos causando intoxicação. Contudo, esta questão foi elucidada na demonstração da toxicidade de Colliers à ivermectina. Ficou claro que essa intoxicação envolve uma mutação com uma diminuição de função na bomba de glicoproteína-P no nível da barreira hemato-encefálica (Geary, 2005).

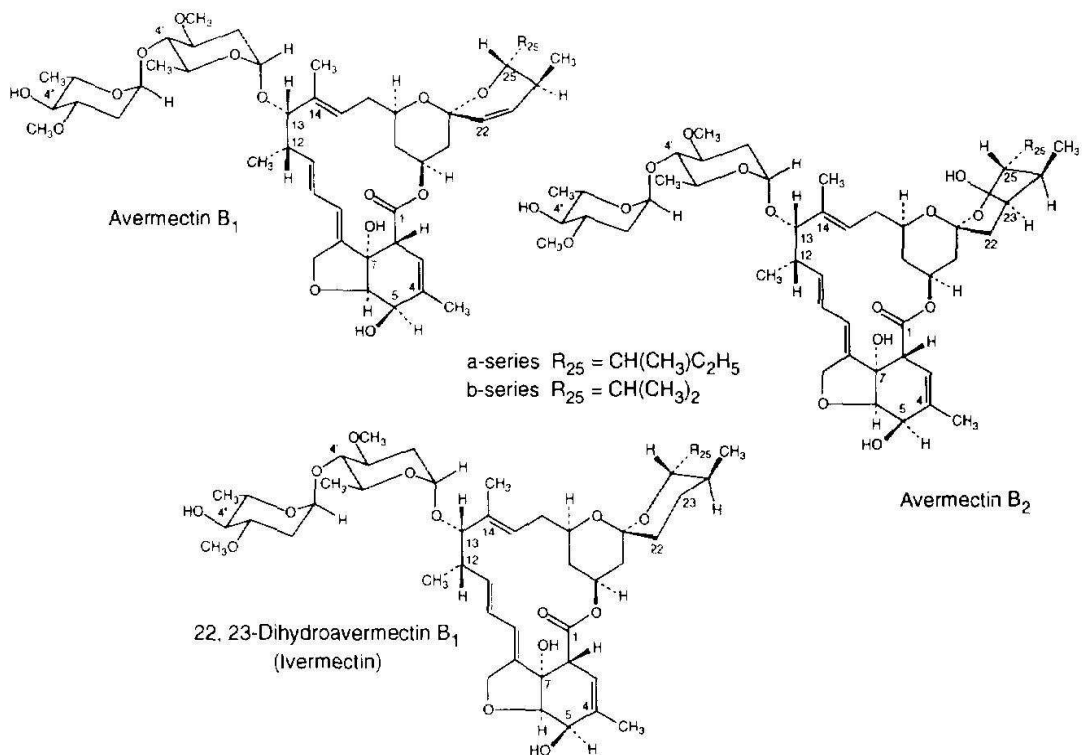


Figura 1 – Estrutura química da avermectina B₁, avermectina B₂ e 22,23-dihidroavermectina B₁ (Shoop e Soll, 2002).

2.2.2 Abamectina

Abamectina é a forma natural de ocorrência da avermectina e difere da ivermectina apenas pela dupla ligação entre os carbonos 22,23. A abamectina, chamada de avermectina B_{1a}, é muito potente contra várias espécies de nematóides gastrintestinais através da administração subcutânea e tem um espectro de eficácia similar ao da ivermectina (Lankas e Gordon, 1989; Shoop e Soll, 2002).

Experimentos com ovinos, utilizando diferentes dosagens de avermectinas, demonstraram que uma modificação na estrutura química da abamectina pode influenciar sua potência e o espectro de ação. Particularmente, a eficácia é similar entre os compostos modificados com exceção de uma queda de eficácia de um composto derivativo acetilado – 4'-O-acetilavermectina B1 – contra formas adultas de *Cooperia*, quando comparada à

abamectina. Essa diferença não foi observada entre o composto abamectina e o composto 22,23-dihidroavermectina B1 (Egerton *et al*, 1979; Egerton *et al*, 1980).

2.2.3 Doramectina

A doramectina é produto da biossíntese de uma cepa mutante do *Streptomyces avermitilis*, que foi utilizada para avermectinas com substituintes na posição do C-25. A fórmula molecular da doramectina é C₅₀H₇₄O₁₄ e tem peso molecular de 899,14. O diferencial desta molécula foi seu perfil farmacocinético decorrente de sua formulação com seu veículo diferenciado. Como moléculas lipofílicas, as avermectinas exibem uma limitada solubilidade aquosa e boa solubilidade em óleo. No momento do desenvolvimento da doramectina o valor dos veículos oleosos aperfeiçoando a farmacocinética e a eficácia da doramectina foi explorada. Este fato ainda não havia

vido aproveitado em outras avermectinas. Dessa maneira o veículo utilizado para a doramectina é o óleo de sésamo/etil oleato na proporção de 90:10 (v/v), o que deu características diferentes da ivermectina que, por sua vez, é formulada com veículo gliceroformol/formodeildo (Conder e Baker, 2002).

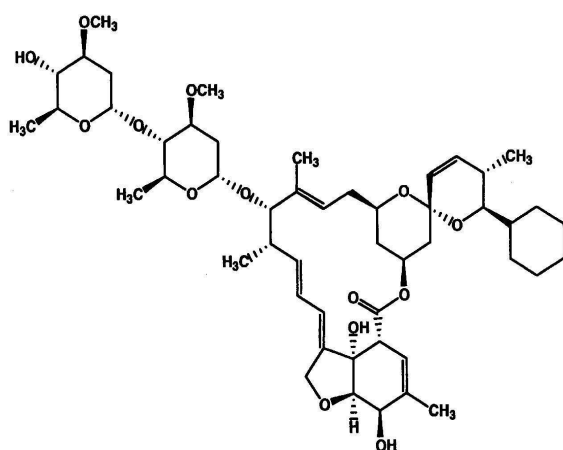


Figura 2 – Estrutura química da doramectina (Conder e Baker, 2002) .

2.2.4 Formulações farmacêuticas

A ivermectina 3,15% foi inicialmente lançada no Brasil em 1998, sob a marca Ivomec Gold® (Rosenthal, 1998). Sua alta concentração do princípio ativo requer uma formulação diferente daquela utilizada nas formulações de ivermectina 1% (Merial, 2007).

Lifschitz *et al* (2007) utilizaram 28 novilhas livres de parasitas e avaliaram o perfil farmacocinético das seguintes formulações anti-helmínticas: Grupo A (GA) - ivermectina 1% (Ivomec®, Merial), na dose de 200 µg/kg; grupo B (GB) - ivermectina 1% (Ivomec®, Merial), na dose de 630 µg/kg; grupo C (GC) - ivermectina L.A. 3,15% (Ivomec Gold®, Merial), na dose de 630 µg/kg e grupo D (GD) ivermectina L.A. 3,15% (Vermectin L.A. Premium®, Lab. Over, Argentina), na dose de 630 µg/kg. Amostras de sangue foram colhidas nos dias 0,5; 1, 2, 3, 4, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70 e 90 após

os tratamentos. Os autores não observaram diferenças estatísticas entre as concentrações plasmáticas das preparações comerciais de ivermectina L.A. 3,15%. A ivermectina foi medida até o limite de 0,5 ng/mL de plasma, e foi observada até o dia 40, 50, 90 e 90 pós-tratamento, para os grupos GA, GB, GC e GD, respectivamente. A concentração máxima (C_{max}) e a área sob a curva (AUC) foram significativamente mais altas na formulação ivermectina 1% administrada com 630 µg/kg do que com 200 µg/kg. Contudo, o valor médio do tempo de residência médio (MRT) foi similar para ambos os grupos. Para GA, GB, GC, e GD, os valores dos parâmetros avaliados foram: C_{max} - 43,3; 114; 26 e 50,6 ng/mL; T_{max} - 1,5; 2,29; 9,14 e 2,14 dias; AUC - 249; 567; 600 e 558 ng dia/mL e MRT - 5,14; 4,38; 21,7 e 13,9 dias. Os autores observaram que; apesar da C_{max} e AUC ter sido maior na ivermectina 1% na dose 630 µg/kg, comparada a 200 µg/kg; não houve diferença significativa entre o valor médio MRT das duas formulações. Dessa forma, eles concluíram que o aumento da dose da ivermectina 1% de 200 µg/kg para 630 µg/kg não prolongou a persistência da concentração de ivermectina no plasma. Do mesmo modo, a administração de 630 µg/kg com ivermectina 1% apresentou similar AUC comparando com as formulações de ivermectina L.A. 3,15%, mas apresentou também um menor valor MRT, o que confirma uma mudança no perfil da persistência quando ocorre a modificação na composição do veículo fármaco, como declarado pelo fabricante do produto utilizado no GC. Comparando as duas formulações de ivermectina 3,15%, a AUC, avaliada 15 dias pós-tratamento, foi menor na preparação utilizada no GC do que no GD, o que indica um processo de absorção diferente entre os produtos. A formulação do GC demonstrou um processo de absorção mais prolongado do que a formulação usada no GD, o que explica a maior persistência detectável para o produto utilizado no GC. Os autores concluíram que as diferenças no perfil da concentração plasmática das ivermectinas, obtidas entre 20 e 90 dias pós-tratamento, para ambas as formulações 3,15%, pode ser suficiente para alcançar 100% de eficácia contra as estirpes

resistentes, mas um perfil diferenciado de atividade pode ser observado com o desenvolvimento da resistência.

No Brasil, a doramectina é comercializada como o produto farmacêutico Dectomax[®] lançado no mercado em 1995 (Pfizer, 2008).

Toutain *et al* (1997) compararam a farmacocinética da doramectina e da ivermectina em bovinos, e observaram que a concentração do pico plasmático é similar nos dois fármacos - 32 ng/ml. Contudo, o tempo da concentração máxima (T_{max}) ocorreu no dia 5,3 para doramectina no dia e 4,0 para ivermectina. A área sob a curva (AUC) medida do dia 0 até o infinito foi maior para doramectina - 511 ng dia/mL - do que para ivermectina - 361 ng dia/mL. Os autores justificaram as diferenças encontradas citando características da doramectina, como o baixo *clearance*, baixo volume de distribuição e alta biodisponibilidade. Segundo os autores, isso pode explicar a longa duração da eficácia da doramectina quando comparada com a ivermectina. Essa diferença entre as farmacocinéticas da doramectina e ivermectina ocorre provavelmente em função da formulação - óleo de sésamo/etiloleato, para a doramectina, e gliceroformol/formoldeído, para a ivermectina - e características moleculares intrínsecas, como ocorre com a não-polaridade da doramectina devido ao seu grupo ciclohexil na posição C-25.

Em 2003 foi lançado no mercado veterinário um produto endectocida chamado Solution 3,5% LA[®], formulado com associação de ivermectina e abamectina, com concentrações de 2,25% e 1,25%; respectivamente (Intervet, 2007).

Santos *et al* (2003) avaliaram os parâmetros farmacocinéticos deste fármaco em bovinos, utilizando dose de 450 µg/kg de ivermectina e 250 µg/kg abamectina, comparativamente às formulações comerciais de abamectina 1% (200 µg/kg), ivermectina 1% (200 µg/kg) e ivermectina 3,15% (630 µg/kg). Os autores compararam a abamectina 1,25% com a abamectina 1%. A ivermectina 2,25%

foi comparada à ivermectina 1% e à ivermectina 3,15%. Foram coletadas amostras de plasma antes do tratamento e nos dias três, sete e a cada sete dias até o dia 119 pós-tratamento. Nas avaliações foi observado que o limite mínimo de quantificação foi de 1ng/mL. A ivermectina 200 µg/kg foi detectada no plasma até o dia 56, a ivermectina 630 µg/kg até o dia 119. As concentrações da ivermectina 630 µg/kg foram maiores do que a ivermectina 450 µg/kg até o dia 77, mas não nas demais observações. A abamectina 250 µg/kg foi detectada até o dia 112, enquanto que a abamectina 200 µg/kg foi observada até o dia 42. A AUC dos fármacos testados foram de 307,1; 1.504,3 e 928,2 ng dia/mL, para ivermectina 200 µg/kg, ivermectina 630 µg/kg e ivermectina 450 µg/kg, respectivamente. Nas formulações com abamectina as AUC foram de 618,1 e 374,4 ng dia/mL para abamectina 250 µg/kg e abamectina 200 µg/kg, respectivamente. As formulações com concentrações de 3,5% e 2,25% de ivermectina demonstraram absorção mais lenta do que as formuladas com ivermectina 1%. A C_{max} foi de 39,56 e 37,11 ng/mL para ivermectina 200 µg/kg e ivermectina 450 µg/kg, respectivamente, e não diferiram estatisticamente entre si; mas foram diferentes da C_{max} da ivermectina 630 µg/kg, que foi de 63,3 ng/mL. Entre as abamectinas a C_{max} foi diferente estatisticamente, sendo de 28,70 e 54,07 ng/mL para abamectina 250 µg/kg e a abamectina 200 µg/kg, respectivamente. Nessa avaliação, o T_{max} foi maior nos fármacos com concentração de avermectinas superiores a 1%, sendo de 3, 3, 11, 14 e 16 dias para ivermectina 200 µg/kg, abamectina 200 µg/kg, ivermectina 630 µg/kg, abamectina 250 µg/kg e a ivermectina 450 µg/kg, respectivamente. Segundo os autores, as diferenças entre a C_{max} e T_{max} dos produtos avaliados ocorreram devido a absorção lenta das avermectinas com concentrações superiores a 1%. A formulação com a associação de avermectinas demonstrou um perfil farmacocinético de formulação de longa ação, quando comparada com as avermectinas 1%, e com similaridade com a formulação com ivermectina 3,15%.

2.2.5 Toxicidade

Na Austrália, Seaman *et al* (1987) relataram casos de reações nervosas em um rebanho de bovinos da raça Murray Grey, após a administração de abamectina. Após ocorrerem mortes de animais com sintomas nervosos, logo após a administração de doses terapêuticas de abamectina, os autores montaram um experimento com 90 animais que haviam sido tratados previamente com o fármaco e 108 animais que não haviam recebido a abamectina. Os animais receberam tratamento com abamectina, na dose terapêutica, ou com o veículo somente. Um animal apresentou sintomas nervosos 48 horas após o tratamento. Este animal mais outro animal, sem sintomas, foram sacrificados e analisados os seus níveis de fármaco no plasma, fígado, cérebro e medula espinhal. As mesmas avaliações foram realizadas em mais quatro animais no experimento e que haviam demonstrado sintomas anteriormente a primeira aplicação do produto, antes do início do experimento. A concentração de abamectina no cérebro do animal que não apresentou sintomas foi de 4µg/kg. Nos demais animais analisados a concentração apresentou um valor médio de 56µg/kg, variando de 40 e 68µg/kg. Segundo os autores, essas concentrações cerebrais sugerem que a alta concentração do princípio ativo no cérebro era responsável pelos sintomas dos animais. Além disso, como esse era um rebanho fechado há 15 anos e não havia outros relatos dessas reações, inclusive em outros rebanhos Murray Grey, os autores sugeriram que havia características intrínsecas neste rebanho que levaram à abamectina à penetrar no sistema nervoso central com mais eficiência do que o esperado.

Em testes de toxicidade a abamectina se mostrou um pouco mais tóxica do que a ivermectina. A DL50 em ratos é entre 14-24 mg/kg para abamectina e 25-40 mg/kg para ivermectina. Apesar das avermectinas apresentarem pouca distribuição no sistema nervoso central de mamíferos, doses altas podem desencadear efeitos tóxicos agudos com manifestações nervosas. Isso tem sido

relatado como efeito no GABA nos cérebros de espécies mamíferas. Em bovinos, a abamectina provocou sinais de intoxicação administrada por via subcutânea na dose de 1,0 mg/kg. Nos níveis de 2,0-8,0 mg/kg e maiores, provocou sinais mais sérios como ataxia, decúbito, coma e morte. Os produtos formulados com abamectina alertam contra o uso em bezerras abaixo de quatro meses de idade (Lankas e Gordon, 1989; Shoop e Soll, 2002).

Shoop e Soll (2002) descreveram o papel da glicoproteína-P na toxicidade das avermectinas. Os autores relataram que a toxicidade das avermectinas depende em parte da atividade da glicoproteína-P. Glicoproteína-P é uma proteína transmembrana localizada em vários tecidos, incluindo a barreira hemato-encefálica, a mucosa do intestino, trato hepatobiliar e placenta. Glicoproteína-P atua como uma proteína transportadora que carrega certas drogas de dentro para fora da célula. A importância da glicoproteína-P na toxicidade das avermectinas se dá pela limitação que a glicoproteína-P promove na entrada das avermectinas dentro dos tecidos potencialmente sensíveis. Então, sua presença serve para reduzir a distribuição no tecido, aumentar a eliminação das avermectinas e, conseqüentemente, reduzir o risco da toxicidade induzida pela avermectina. No sistema nervoso central, a glicoproteína-P é encontrada nas células do endotélio dos capilares. Isso tem particular efeito na barreira hemato-encefálica, já que essa barreira reduz a permeabilidade dos vasos capilares. Uma vez ligada, a avermectina é transportada pela glicoproteína-P de dentro para fora da célula endotelial e de volta para o lume do capilar, prevenindo assim, sua difusão no SNC. Dessa forma, a presença glicoproteína-P nas células endoteliais dos capilares do cérebro afeta o nível tecidual e, por último, a suscetibilidade aos efeitos neurológicos agudos causados pela avermectina. Assim, a presença da glicoproteína-P nos intestinos, barreira hemato-encefálica e placenta serve como uma importante barreira de proteção biológica para qualquer efeito adverso à saúde provocado pelas avermectinas.

Animais com deficiência de glicoproteína-P absorvem mais ivermectina após a administração oral, desenvolvendo altos níveis de ivermectina no sangue, acumulando grandes quantidades de ivermectina no SNC, e aparentemente ficando mais sensível aos efeitos diversos à saúde da ivermectina do que animais com quantidades normais de glicoproteína-P.

Para avaliar a toxicidade de um fármaco composto por 2,25% de ivermectina mais 1,25% de abamectina, em bovinos abaixo de quatro meses de idade, Rodrigues *et al* (2007) utilizaram 16 bezerros de 30 dias de idade. Além do grupo controle, foram avaliados três diferentes níveis de dosagens de ivermectina e abamectina, respectivamente: 450µg/kg + 250µg/kg, 900µg/kg + 500µg/kg e 1350µg/kg + 750µg/kg. Os bovinos foram examinados duas vezes por dia, por 14 dias. Sangue e líquido cérebro-espinhal foram coletados nos dias 0, 1, 7 e 14 pós-tratamento. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos do sangue: proteína total, e enzimas AST/GOT, GGT e AP. No líquido cérebro-espinhal foram avaliados o pH, densidade, leucócitos, eritrócitos, proteína, glicose e as enzimas CK/CPK, ALT/GPT e LDH. Em nenhum dos parâmetros avaliados houve diferença entre o grupo controle e os tratados. Dessa maneira, os autores concluíram que o fármaco é bem tolerado por bovinos jovens.

2.2.6 Eficácia e persistência.

Eddi *et al* (1993) publicaram dois estudos, um na Argentina e outro no Brasil, para avaliar a eficácia terapêutica da doramectina administrada por via subcutânea na dose de 200 mg/kg em bovinos parasitados por diferentes nematóides gastrintestinais. A eficácia da doramectina foi 99% contra estágios adultos de *O.ostertagi*, *H. placei*, *H. similis*, *T. axei*, *T longispicularis*, *C. oncophora*, *C. punctata*, *C. pectinata*, *C. spatulata*, *C. mcmasteri*, *O. radiatum* e *Dictyocaulus viviparus*. A eficácia contra *Nematodirus helvetianus* foi de 97,9%, bem como a eficácia contra *T. discolor* que foi 92,3%. A atividade contra larvas inibidas de

O. ostertagi, *H. placei*, *O. radiatum* e *T. axei* foi de 99,9%.

Segundo Lima *et al.* (1995), a doramectina foi 100% eficaz contra estágios adultos dos principais nematódeos: *Cooperia pectinata*, *C. punctata*, *C. spatulata*, *Dictyocaulus viviparus*, *Haemonchus contortus*, *H. similis*, *Haemonchus* sp., *Oesophagostomum radiatum*, *Ostetargia ostertagi*, *Trichostrongylus axei* e *Trichuris discolor*. A eficácia contra *Trichostrongylus colubriformis* foi de 99,4%.

Grisi *et al.* (1995) avaliaram a eficácia anti-helmíntica e berricida de ivermectina 1% e abamectina 1%, soluções injetáveis em bovinos. Trabalhando com trinta bovinos mestiços na idade de seis a doze meses, foram montados cinco grupos. Grupo controle, grupo ivermectina 1% marca A, ivermectina 1% marca B, abamectina 1% marca C e abamectina 1% marca D. Foram realizados exames de OPG no dia zero e dia 12 p.t.. Para identificação das espécies de helmintos os animais foram sacrificados ao fim do experimento. Para avaliação das infestações por bernes, foram contadas as larvas vivas presentes nos nódulos subcutâneos. Para cálculo de eficácia foram utilizadas as infestações do grupo controle nos helmintos e as infestações do dia 0 para as larvas da *Dermatobia hominis*. As espécies encontradas foram: *Haemonchus placei*, *Ostetargia ostertagi*, *Trichostrongylus axei* *Cooperia punctata*, *Bunostomum phlebotomum*, *Oesophagostomum radiatum*, *Trichuris discolor* e *Dictyocaulus viviparus*. A eficácia dos produtos de acordo com a necropsia variou, para ivermectina 1% marca A e marca B, entre 96,3% e 100%, e 99,0% e 100% respectivamente. A eficácia para abamectina 1% marca C e marca D foi de 100% para ambos os casos. Com relação ao berne, ambas marcas de ivermectina 1% apresentaram eficácia de 100% entre a primeira e segunda semana pós-tratamento. Quando foram avaliados os animais do grupo da ivermectina marca A aos 43 dias p.t., observou-se 94,0% de eficácia. A eficácia contra bernes dos grupos abamectina marca C e D, variou entre 99,5% e 100%.

Lima (1995) avaliou o controle de endo e ectoparasitos e a relação custo/benefício em novilhas de rebanhos leiteiros em Minas Gerais. Trabalhando com fazendas de quatro diferentes microrregiões de Minas Gerais, esse autor montou três grupos com tratamentos realizados em maio e agosto, sendo: grupo controle - sem tratamento, grupo tratado - ivermectina e grupo tratado - albendazole ou oxfendazole. Realizando pesagens e contagens de OPG a cada quatro semanas e, na mesma ocasião, sorteando cinco animais de cada grupo para contagem de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* e para a contagem de larvas de *D. hominis*, o autor observou que os gêneros recuperados nas coproculturas foram *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*. Além destes, em duas propriedades foram recuperadas larvas de *Bunostomum* sp. Durante os sete meses de duração do experimento foi observado que a diferença de ganho de peso nas quatro microrregiões entre o grupo tratado com ivermectina e o grupo controle, foi de 22,4 Kg; 11,77 Kg; 17,10 Kg e 13,66 Kg; a favor dos grupos tratados. Finalmente, o autor observa que os diferentes manejos nutricionais das fazendas contribuíram para refletir as diferenças no ganho de peso entre as microrregiões.

Leite *et al.* (1997) estudaram a eficácia comparativa de duas doses de doramectina com duas doses de ivermectina contra ectoparasitos e endoparasitos e o ganho de peso de gado de corte de engorda num período de 140 dias. O critério de comparação foi contagem de carrapatos, contagem de bernes, OPG e ganho de peso. O trabalho mostrou que a doramectina foi significativamente mais eficaz no controle dos carrapatos e na redução do OPG do que a ivermectina. As contagens dos nódulos da *D. hominis* foram muito baixas nos dois tratamentos. Os autores demonstraram ainda que a média do ganho de peso no grupo tratado com doramectina foi maior significativamente, sendo de 39,7Kg; enquanto que o grupo tratado com ivermectina foi de 31,5Kg.

Meeus *et al.* (1997) compararam a persistência da eficácia de uma aplicação de ivermectina, abamectina, doramectina e moxidectina em bovinos, em Zâmbia, durante 84 dias. Esses autores observaram que não houve diferença estatística no ganho de peso entre os grupos. Os gêneros encontrados foram *Cooperia* 90%, *Haemonchus* 7%, outros 3%. Ainda foi possível observar que não houve diferença significativa entre os grupos na contagem de OPG. A eficácia ficou por volta de 95% até 42 p.t. e caiu para 84% no dia 84 p.t. A contagem do grupo controle foi de pouco mais de 250 ovos por grama de fezes no dia 42 e em torno de 250 no dia 84, demonstrando uma baixa pressão de infecção.

Lima *et al.* (1997) trabalharam com quarenta bezerros mestiços que aos trinta dias de idade foram divididos em dois grupos de 20 animais, grupo controle e grupo tratado com ivermectina oral mensalmente até o vigésimo sexto mês de idade. Mensalmente os autores realizaram a pesagem e coleta de fezes para OPG e coprocultura. Além disso, os autores utilizaram animais traçadores e observaram a prevalência do gênero *Cooperia*, sendo *C. punctata* a espécie mais prevalente. Seguido pelo *Haemonchus placei*. Na contagem de OPG a ordem *Strongylidae* foi positiva para ambos os grupos a partir dos dois meses de idade, demonstrando que os animais se infectaram antes dessa idade. Esses autores observaram também que as contagens aumentaram gradativamente até o décimo e oitavo mês. Após esse período houve decréscimo nas contagens que continuaram baixas até o final do experimento. O grupo tratado apresentou contagens menores do que o grupo controle. Com relação ao desenvolvimento ponderal foi observado que a média de peso final do grupo controle foi de 335,4 Kg e do grupo tratado foi de 389,2 Kg, com uma diferença média de 53,8Kg a favor do grupo tratado.

Trabalhando com infecções controladas, Ballweber *et al.* (1999) avaliaram a persistência da doramectina contra *Haemonchus placei*. Os autores trabalharam

com 42 bezerros abaixo de seis meses de idade, e concluíram que a doramectina foi capaz de reduzir a infecção com eficácia maior ou igual a 96,9% até o dia 28 p.t.

Williams *et al.* (1999) compararam a persistência da eficácia de lactonas macrocíclicas contra infecções naturais de nematódeos gastrintestinais em bovinos. Os autores utilizaram grupos tratados com doramectina, ivermectina, eprinomectina e moxidectina. Neste experimento com duração de 112 dias, utilizando animais de nove a doze meses, os autores observaram que houve uma queda no OPG dos animais do grupo controle do dia 0 para o dia 7; de 193,7 para 96,8 ovos por grama de fezes; e uma queda do dia 49 até o dia 112. Essa variação nos animais do grupo controle foi atribuída à imunidade adquirida dos animais. Com relação aos resultados, foi observado que a eprinomectina e a moxidectina tiveram os melhores resultados até o dia 28 p.t., sendo a eficácia acima de 95,6%. Ao passo que os demais grupos tratados oscilaram entre 43,6 e 94,2% de eficácia no mesmo período. Especificamente no dia 7 p.t. a doramectina, eprinomectina e moxidectina tiveram menores contagens, com resultados acima de 95% de eficácia, do que o grupo controle e o grupo da ivermectina. Este último grupo apresentou um resultado de apenas 71%. Em todo período experimental a ivermectina sempre esteve abaixo de 90% de eficiência. A doramectina esteve abaixo de 90% a partir do dia 14 p.t. até o final das observações. Com relação ao grupo da eprinomectina foi demonstrado que a eficácia esteve acima de 90% até o dia 42 p.t., exceto no dia 35 que foi de 85,2%. Já o grupo da moxidectina esteve acima de 90% até o dia 28 p.t., após esse período esteve abaixo desse valor. Segundo os autores, *Cooperia* sp. foi o gênero predominante, com 32–57% de prevalência, seguido de perto por *Ostertagia* sp., com 30–33%. Observando o ganho e o peso total, o grupo controle apresentou valores menores do que todos os grupos a partir da segunda observação, exceto com relação ao peso total do grupo da ivermectina nos dias 84 p.t. e 112 p.t.; e em relação ao ganho de peso do mesmo grupo no dia 112 p.t., ou

seja, nesses períodos citados, em termos de ganho de peso e peso total, o grupo da ivermectina e do controle se igualaram. O peso médio e o ganho de peso do grupo da moxidectina foram maiores do que o grupo controle e do grupo da ivermectina a partir do dia 56 p.t. até o final do experimento. Porém, o peso médio do grupo da moxidectina continuou estatisticamente igual ao da eprinomectina e da doramectina durante todo o experimento.

Guimarães *et al.* (2000) utilizaram 80 bezerros com idade entre oito a 10 meses, naturalmente infectados com os gêneros *Haemonchus*, *Cooperia*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus* que foram divididos em quatro grupos de 20 animais, todos tratados com 200 µg/kg de peso vivo de ivermectina, sendo: Grupo 1 tratado em abril e outubro; grupo 2 tratado em abril, agosto e outubro; grupo 3 tratado em abril, agosto, outubro e dezembro; e o grupo 4 foi deixado sem tratamento como grupo controle. Os autores observaram que não houve diferença estatística nos valores de OPG entre os grupos tratados. Quando comparado com o grupo controle o grupo 1 não foi estatisticamente diferente. Somente os grupos 2 e 3 apresentaram redução significativa do OPG quando comparados ao grupo controle. Da mesma maneira não houve diferença estatística entre os grupos 1 e 4, tampouco entre os grupos 2 e 3, quando analisados o peso vivo médio dos grupos. Entretanto, os autores observaram que houve diferença entre os grupos 2 e 4, e 3 e 4. Assim, os tratamentos dos grupos 2 e 3 apresentaram os melhores resultados na redução do OPG e no ganho de peso dos animais.

Vercruysse *et al.* (2000) avaliaram a persistência da eficácia da doramectina e da ivermectina injetáveis contra diferentes níveis de infecções artificiais de *Ostertagia ostertagi* e *Cooperia oncophora* em bovinos. Utilizando infecções moderadas de 1.000 L3/dia, e infecções altas de 10.000 L3/dia, esses autores observaram que a produção de ovos nas fezes foi completamente suprimida nos grupos de moderada e alta infecções tratados com doramectina, durante todo o estudo, até o 39 dia p.t. Nos

grupos que foram tratados com ivermectina e receberam infecções moderadas e infecções altas, a redução da infecção foi de 100% até dia 29 p.t., no dia 39 p.t de 94%, no grupo de infestação moderada, e 96% no grupo com infestação alta. À necropsia observou-se que a ivermectina não teve eficácia em ambas as infecções por *Cooperia* sp., com os resultados na infecção moderada de 51,1% e na infecção alta de 46,3%.

Taylor *et al.* (2001), utilizando infecções controladas de *Cooperia oncophora* em bovinos, avaliaram dois grupos tratados, um com moxidectina e outro com doramectina, ambos "pour-on". Os autores perceberam que a doramectina foi mais persistente do que a moxidectina, com diferença estatística nas contagens de ovos dos dias 28, 35 e 42 p.t.

2.3 MERCADO FARMACÊUTICO VETERINÁRIO

O mercado farmacêutico veterinário faturou pouco mais de 2,3 bilhões de reais no ano de 2006. Esse notável faturamento foi alcançado com um crescimento de 149,27% entre 1997 e 2006 (Tab. 1).

O principal segmento da indústria farmacêutica veterinária é a bovinocultura, representando mais de 56% do faturamento total anual, seguido pelo segmento de aves com 15,4% de participação de mercado (Fig. 3, Anexo I).

Entretanto, o comportamento da variação das vendas de produtos farmacêuticos foi extremamente diferente entre as duas espécies animais. A variação foi 50,12% positiva em bovinos, mas 18,17% negativa em aves (Tab. 2).

Tabela 1 – Faturamento (R\$) e crescimento (%) do mercado farmacêutico veterinário. Brasil, 1997 – 2006.

Ano	R\$	Varição base ano anterior (%)	Varição ano base 1997 (%)
2006	2.302.303.276	4,14	149,27
2005	2.210.795.586	7,41	139,36
2004	2.058.202.871	10,11	122,84
2003	1.869.203.030	9,07	102,38
2002	1.713.696.010	14,05	85,54
2001	1.502.530.732	6,34	62,68
2000	1.412.968.610	15,94	52,98
1999	1.218.696.211	21,82	31,95
1998	1.000.406.587	8,31	8,31
1997	923.629.719	-	-

Fonte: Sindan, 2007a.

Esse crescimento das vendas de produtos farmacêuticos em bovinos reflete o crescimento no número de animais. No Brasil o crescimento total do rebanho bovino, entre 1997 e 2005, foi de 28,34%. Contudo, a taxa de crescimento foi diferente entre as regiões do país. As regiões Sudeste e Sul tiveram crescimento menor do que a média nacional com 5,32% e 4,07%, respectivamente. Na região Nordeste houve um crescimento de 13,17%, também abaixo da taxa nacional. A região

Centro-oeste cresceu 31,78%. O maior crescimento foi o da região Norte, com 114,99% (Tab. 3).

Esse crescimento representativo do faturamento na bovinocultura foi estimulado por duas classes terapêuticas: Biológicos e Antiparasitários. No ano de 2006 a participação do segmento de biológicos foi de 29,97%, enquanto o segmento de antiparasitários liderou a participação em vendas com 33,89% (Figura 4, Anexo II).

Tabela 2 – Faturamento (R\$) e variação (%) do mercado farmacêutico veterinário por espécie animal. Brasil, 2002 – 2006.

Espécie / ano	2002 (R\$)	2006 (R\$)	Variação (%)
Bovinos	868.844.000	1.304.332.383	50,12
Aves	433.285.000	354.569.348	-18,17
Pets	154.233.000	259.783.093	68,44
Suínos	149.261.000	249.892.922	67,42
Ovinos e Caprinos	56.662.000	69.069.098	21,90
Eqüinos	51.411.000	64.656.432	25,76
Total	1.713.696.000	2.302.303.276	34,35

Fonte: Sindan, 2007a.

O segmento de antiparasitários é dividido em três classes terapêuticas: ectoparasiticidas – inclui os produtos de contato para combate de artrópodes parasitos, endoparasiticidas – abrange os produtos comercializados para

controle dos endoparasitos e os endectocidas – produtos formulados com lactonas macrocíclicas e utilizados para controle de endoparasitos e ectoparasitos.

Tabela 3 – Rebanho bovino. Brasil, 1997 – 2005.

Região / ano	1997	2005	Variação (%)
Norte	19.297.809	41.489.002	114,99
Nordeste	23.830.908	26.969.286	13,17
Sudeste	36.977.462	38.943.898	5,32
Sul	26.683.421	27.770.006	4,07
Centro-oeste	54.626.557	71.984.504	31,78
Brasil	161.416.157	207.156.696	28,34

Fonte: IBGE, 2007.

No mercado farmacêutico de antiparasitários a participação dos endoparasiticidas diminuiu de 30,68% em 2002 para 24,00% em 2006. Enquanto que os ectoparasiticidas mantiveram a participação estável neste período, ocupando uma fatia de 36,75% nas vendas dos antiparasitários. Os endectocidas aumentaram a participação de 32,88% em 2002, para 39,24% em 2006 (Figura 5, Anexo III).

Esse aumento da participação dos endectocidas no grupo de antiparasitários é

reflexo do crescimento de suas vendas. Entre 2002 e 2006, os produtos para controle de endoparasitos apresentaram um decréscimo nas vendas de 2,43%. Enquanto os ectoparasiticidas mantiveram a média de crescimento – 25,81% – próxima do segmento total de antiparasitários – 24,73%. Os endectocidas apresentaram um crescimento notável de 48,88%, representando quase o dobro do crescimento da classe total de antiparasitários (Tab. 4).

Tabela 4 – Faturamento (R\$) e variação (%) do mercado farmacêutico veterinário por grupos de antiparasitários. Brasil, 2002 – 2006.

Antiparasitários	2002 (R\$)	2006 (R\$)	Variação (%)
Ectoparasiticidas	227.921.569	286.757.534	25,81
Endectocidas	205.643.521	306.153.383	48,88
Endoparasiticidas e vermífugos	191.933.953	187.277.488	-2,43
Total	625.499.043	780.188.405	24,73

Fonte: Sindan, 2007.

Aliado a esse notável crescimento no consumo há o problema do controle de qualidade dos produtos atualmente comercializados. Segundo Monteiro *et al* (1998), a licença para produtos farmacêuticos veterinários em uso na maioria dos países normalmente requer que estes produtos sejam seguros, eficazes e de alta qualidade. A qualidade de um produto pode afetar sua segurança e eficácia. Devido à vários trabalhos, no Kenya, que indicam que alguns anti-helmínticos tem uma eficácia menor do que a esperada, os autores avaliaram alguns aspectos da qualidade farmacêutica dos anti-helmínticos comercializados naquele país. Os seguintes produtos foram avaliados: Deworming® (Pharma and Horticultural Inputs) - levamisol 15%; Deworming plus® (Pharma and Horticultural Inputs) - levamisol 15% mais

bithionol 8%; Levaverm® (Mult Vet) - levamisol 15%; Nilzan plus® (Cooper) - levamisol 15%, oxyclozanide 3,0% e sulfato de cobalto 0,382%; Nematuff-P® (Meditec Lab) - levamisol 15% mais mebendazol 5%; Vermofas® (Bimeda) - levamisol 1,5% mais oxyclozanide 3,0% e Wormicid plus® (Cosmos) - levamisol 1,5% mais bithionol 8,0%. Os produtos tiveram sua concentração medida pela Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) dentro do prazo de validade de cada produto. Cinco repetições de cada produto foram realizadas. Após esses, mais testes foram realizados, agora analisando muitos lotes diferentes do mesmo produto e diferentes frascos do mesmo lote. Os resultados demonstraram que muitas formulações que indicavam ter levamisol na fórmula, apresentavam muito pouca concentração do

princípio ativo indicado na bula. Nos produtos Nematuff-P® e Deworming® não foi detectado levamisol, nos produtos Levaverm® e Deworming plus® foi detectado apenas 11,8% e 78,7% do indicado na bula, respectivamente. O produto Nilzan plus® apresentou a mesma concentração indicada na bula. Nos produtos Vermofas® e Wormicid plus® foi detectado valores acima do indicado no bula, 106,0% e 120,6%, respectivamente. Dessa maneira, os autores concluíram que os produtos anti-helmínticos comercializados no Kenya são de baixa qualidade. Como consequência, os tratamentos com esses produtos são ineficazes, levando a crer que exista um nível de resistência anti-helmíntica irreal. Além disso, os produtos com níveis baixos de princípio ativo podem selecionar populações de helmintos que têm uma base poligênica para resistência anti-helmíntica.

2.4 RESISTÊNCIA.

Na década passada, nematóides gastrintestinais custavam, estimativamente, por volta de 220 milhões de dólares australianos por ano para a indústria pecuária da Austrália. Devido a seleção e disseminação da resistência anti-helmíntica, a previsão com a perda de produção e aumento de intervenções no manejo associado com o impacto adverso dos nematóides gastrintestinais, poderia ultrapassar os 700 milhões de dólares australianos por ano na próxima década. Consequentemente, isso traria consequências devastadoras para empresas de exploração ovina (Lloyd *et al*, 2005).

Sangster (2001) afirma que, apesar dos relatos ainda serem isolados, a resistência dos nematódeos parasita de bovinos parece estar aumentando. O autor conclui que esse é um evento de sérias consequências à pecuária mundial, já que a maioria dos relatos é a respeito da resistência à um anti-helmíntico largamente utilizado, a ivermectina, e por um gênero de nematódeo altamente prevalente, a *Cooperia* sp.

2.4.1 Mecanismos de resistência anti-helmíntica

Mottier e Lanusse (2001) conceituam resistência adquirida às drogas, como o fenômeno que se dá quando populações sensíveis à um fármaco têm sua condição de sensibilidade modificada devido a ocorrência de modificações genéticas herdáveis de geração para geração. Esses autores citam ainda que as bases bioquímico-moleculares que promovem a diminuição do efeito da droga são: 1) modificação da captação da droga no sítio de ação e/ou aumento do seu metabolismo/inativação e/ou excreção. 2) Mudança no sistema enzimático necessário para produzir o efeito da droga. 3) Alteração nos receptores celulares da droga, por diminuição do seu número ou da sua afinidade.

Didier e Loor (1996) trabalharam com um forte agente reversor da glicoproteína-P em células cancerígenas resistentes, o SDZ PSC 833, um derivativo da ciclosporina D. Após o tratamento com o SDZ PSC 833, ratos demonstraram um decréscimo de tolerabilidade à ivermectina, apresentando disfunção do sistema nervoso central induzido pela ivermectina. Esses achados foram interpretados como uma neutralização da glicoproteína-P no nível da barreira hemato-encefálica, implicando que ivermectina seja substrato, e também um inibidor, para glicoproteína-P.

O completo mecanismo de resistência dos nematóides parasitas às ivermectinas é atualmente desconhecido, contudo alguns trabalhos propõem mecanismos da resistência, bem como demonstram a resistência cruzada entre as avermectinas. Xu *et al.* (1998) encontraram algumas glicoproteínas-P e proteínas de resistência a várias drogas, como proteínas transportadoras na membrana bombeando drogas do interior da célula. Estes autores acreditam que as glicoproteínas-P estejam envolvidas no mecanismo de resistência as ivermectinas.

Borges *et al* (2005) avaliaram o efeito do verapamil, um modulador da glicoproteína-

P, na eficácia da ivermectina contra isolados selecionados de *Haemonchus contortus* em ovinos naturalmente infectados. Três grupos foram montados: ivermectina 200µg/kg, verapamil 3 mg/kg e ivermectina mais verapamil administrados consecutivamente. Amostras fecais foram coletadas sete e 14 dias após o tratamento. A porcentagem de redução fecal foi realizada utilizando a média aritmética dos grupos antes do tratamento. O tratamento com verapamil não foi eficaz no controle da verminose. A eficácia do tratamento com ivermectina foi de 72,60% e 0% nos dias 7 e 14, respectivamente. A eficácia da ivermectina mais verapamil foi de 81,05% e 74,71%, respectivamente. Os gêneros encontrados na cultura foram: 94% de *Haemonchus* sp. e 6% de *Cooperia* sp. Os autores concluíram que o verapamil aumentou a eficácia da ivermectina em 43%.

Lifschitz *et al* (2007) avaliaram os efeitos da loperamida, um agente modulador da glicoproteína-P, na farmacocinética e eficácia da ivermectina e moxidectina contra nematóides resistentes em bovinos. Foram utilizados 50 bovinos, separados em um grupo controle e quatro grupos tratados. Cada grupo foi tratado com diferentes produtos, ivermectina, moxidectina, e cada uma das lactonas mais loperamida. *Cooperia* sp. e *Ostertagia* sp. foram os gêneros predominantes no pré-tratamento. A eficácia das lactonas sozinhas foram: ivermectina - 23% e moxidectina - 69%, confirmando a presença de resistência. Nos grupos em que foram utilizadas as associações, a loperamida aumentou a concentração plasmática de ivermectina e moxidectina. O agente modulador da glicoproteína-P também aumentou a eficácia das lactonas macrocíclicas. A eficácia da loperamida com a ivermectina foi de 50% e com a moxidectina foi de 87%.

Lespine *et al* (2007) estudaram o uso de inibidores de glicoproteína-P no restabelecimento da susceptibilidade à ivermectina em estirpes de nematóides resistentes. Os autores avaliaram diferentes concentrações de ivermectina em larvas de primeiro estágio, susceptíveis e resistentes, de *Teladorsagia circumcincta* e

Haemonchus contortus, utilizando teste de inibição larval na presença e na ausência das substâncias valdospar, ketoconazol e pluronico85. O fator de resistência de *T. circumcincta* e *H. contortus* foi calculado em 1,4 e 4,4, respectivamente. Nestas estirpes resistentes os valores de inibição larval foi reduzido com a presença de inibidores, levando um aumento nos fatores de susceptibilidade para ambas espécies de helmintos. Os autores concluíram que a função da glicoproteína-P é um dos fatores chave envolvido na resistência dos nematóides e que os agentes reversores da glicoproteína-P podem representar uma estratégia atrativa no controle da difusão da resistência anti-helmíntica.

Roulet e Prichard (2007) analisaram diferentes cDNA de P-glicoproteína de *Haemonchus contortus* e os compararam com seqüências de glicoproteína-P no genoma de *C. elegans*. Foram medidos os níveis de mRNA de seis glicoproteínas-P em quatro estirpes de *H. contortus*. Uma estirpe susceptível (PF), duas estirpes de laboratório derivadas da estirpe PF, selecionadas com ivermectina e moxidectina, e uma estirpe de campo multi-resistente, inclusive para lactonas macrocíclicas (Wallangra). A seleção com ivermectina resultou em um aumento na expressão constitutiva de muitas das glicoproteínas-P, enquanto que a seleção com moxidectina também resultou em um aumento na expressão constitutiva de algumas das glicoproteínas-P; mas, em geral, em uma extensão menor do que a ivermectina. Esses resultados demonstraram que a expressão excessiva constitutiva ou induzida de algumas glicoproteínas-P está associada com a seleção e resistência para ivermectina ou moxidectina. Embora os perfis da glicoproteínas-P são, em parte, diferentes para moxidectina quando comparada com a seleção para ivermectina.

Gilleard (2006) fez uma revisão sobre o conhecimento atual sobre a genética da resistência anti-helmíntica. Segundo o autor, a compreensão da resistência aos benzimidazóis está mais avançada do que para as outras principais classes de anti-

helmínticos. Sabe-se, por exemplo, que o maior determinante para a resistência à essa classe de drogas são mutações no gene isotipo-1 de β -tubulina, na maior parte dos nematóides. Contudo, existem evidências que a situação seja mais complexa e que outros *loci* possam estar envolvidos. O conhecimento à respeito da resistência contra as tetrahidropirimidinas/imidazotiazóis e lactonas macrocíclicas está menos avançada, e embora vários genes estejam envolvidos na contribuição da resistência a importância deles ainda não é conhecida. Além disso, ainda não está claro como os alelos para resistência surgem, são selecionados e se espalham em populações de parasitas, e também como os mecanismos de resistência diferem entre as diferentes espécies parasitas ou entre diferentes estirpes nas mesmas espécies. A maior prioridade que surgiu nas pesquisas nos últimos anos é o desenvolvimento de testes de diagnósticos moleculares acurados, para avaliar o nível de resistência em populações de parasitas. Contudo, o grande fator limitante para estes testes se tornarem realidade não é a tecnologia ou o custo, mas sim a pouca compreensão que se tem sobre a base molecular e genética da resistência anti-helmíntica. Praticamente todo o conhecimento sobre os possíveis mecanismos de resistência anti-helmíntica está baseado em estudos de genes candidatos. Esse método também é utilizado para pesquisa sobre a resistência contra as lactonas macrocíclicas. Desse modo, um crescente número de genes tem sido implicado na resistência à ivermectina em *H. contortus*, predominantemente demonstrando um redução no polimorfismo ou seleção de genes, em particular nas populações resistentes. Esses genes incluem uma subunidade do canal de cloro aberto pelo glutamato (GluCl α), um canal do ácido γ -aminobutírico, glicoproteínas-P e uma suposta subunidade de canal aberto por um anion amino-ácido (HG1). Mais recentemente, tem sido sugerido que vários genes em *Onchocerca volvulus* podem ser selecionados pelo tratamento com ivermectina, incluindo genes para glicoproteínas-P, β -tubulina e uma variedade de outros genes. Consequentemente, esse conjunto de

informações nos leva a crer que o mecanismo de resistência é complexo com vários alelos em muitos *loci*, contribuindo para o fenótipo da resistência. Contudo, nenhum estudo confirmou ainda a importância maior de alguns do *loci*, exceto em um caso, a GluCl α de *C. oncophora* de bovinos. Neste caso, está certo que o polimorfismo na GluCl α é um mecanismo de resistência anti-helmíntica. Entretanto, este particular polimorfismo ainda não foi demonstrado em outras espécies nematóides com resistência à ivermectina. Experimentos com mutações forneceram informações sobre mais de 30 diferentes *loci* que podem desenvolver a resistência em *Caenorhabditis elegans*, mas em níveis relativamente baixos. Entretanto, foi demonstrado que a mutação simultânea em três diferentes canais de cloro aberto pelo glutamato, em *C. elegans*; *avr-14* (GluCl α 3), *avr-15* (GluCl α 2) e *glc-1* (GluCl α 1); confere alto nível de resistência à ivermectina, enquanto que a mutação em somente dois destes genes não. Isso sugere que cada uma dessas subunidade de receptor está envolvida em vias paralelas no mecanismo de ação e, como suposto, que *avr-15* age no músculo faríngeo enquanto que *avr-14* e *glc-1* agem em neurônios reguladores de funções da faringe. Além disso, mais estudos genéticos e bioquímicos sugerem que esses três são os alvos chave da ivermectina. Contudo, está claro que outros genes, que não codificam o alvo da droga, podem conferir resistência em *C. elegans*. Para uma compreensão mais clara, o autor resume que os experimentos com mutação em *C. elegans* sugerem que um grande número de genes podem sofrer mutação e dar surgimento à baixos níveis de resistência à ivermectina, mas o alto nível de resistência requer múltiplas mutações em genes independentes. Por outro lado, o conhecimento gerado pela mutação química forçada de *C. elegans* em laboratório pode ser muito diferente do processo de seleção de parasitas resistentes aos anti-helmínticos no campo. Desse modo, os estudos com *C. elegans* funcionam como um ponto de partida para o estudo de espécies parasitas no campo. Estudos de diferentes estirpes resistentes à ivermectina sugerem que

exista diferenças genotípicas que podem implicar em diferentes mecanismos de ação envolvidos. Como exemplo, podemos constatar que muitos isolados de *H. contortus* resistentes à ivermectina demonstram diferenças na habilidade da avermectina em inibir o seu desenvolvimento e motilidade *in vitro*. Esses isolados também demonstraram diferenças em suas sensibilidades relativas aos diferentes membros do grupo das lactonas macrocíclicas. Isso pode sugerir que o fator chave para a determinação do mecanismo de resistência possa ser a natureza do processo de seleção. Seleção gradual usando uma série de infecções experimentais com tratamentos com doses sub-terapêuticas da droga, pode ser eficiente em selecionar para a resistência com uma base multigênica. Enquanto, uma seleção mais rápida usando concentrações terapêuticas da droga podem ser mais eficientes em selecionar para um simples gene. O autor conclui que, apesar de, por enquanto, isso ser especulação, o limitado conhecimento sobre a genética da resistência à ivermectina suporta essa hipótese.

Várias são as modificações encontradas em helmintos resistentes, mudanças no receptor alvo das lactonas macrocíclicas, ação da glicoproteína-P e alterações no anfídeo. Mottier e Prichard (2007) consideraram essas mudanças para analisar os genes isotipos 1, 2 e 3 da α - e β -tubulina, de diferentes estirpes de *Haemonchus contortus*, de laboratório e de campo. Os autores demonstraram que o uso repetido de ivermectina ou moxidectina muda a frequência dos alelos isotipo 1 de β -tubulina e seleciona para polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) específicos. Tratamentos com lactonas macrocíclicas seleciona para mudança em três aminoácidos na β -tubulina. Dois desses SNP têm sido descritos conferindo resistência aos benzimidazóis. Dessa forma, a seleção com lactonas macrocíclicas pode induzir a resistência aos benzimidazóis.

2.4.2 Métodos de detecção da Resistência.

Dentre os métodos de comprovação de resistência de helmintos às drogas, existem os que são realizados *in vivo* e outros *in vitro*. Em uma revisão dos métodos de eficiência do anti-helmínticos Taylor *et al.* (2002) descrevem dois testes realizados *in vivo*. No primeiro, o FECRT, os autores afirmam que apenas nos dá uma estimativa da eficiência do anti-helmíntico, pois só mede a produção de ovos de fêmeas adultas e nem sempre há uma correlação com a carga de vermes. Contudo, uma boa correlação entre a contagem de ovos nas fezes e a contagem de vermes foi encontrada para *Haemonchus* sp., mas não para *Trichostrongylus colubriformes* ou *Ostertagia circumcincta*. Outro teste que pode ser utilizado *in vivo* é o teste controlado, esse é mais confiável, mas também de maior custo. Animais livres de vermes são infectados com uma quantidade conhecida de formas infectantes e são medicados com 0,5; uma e duas vezes a dose recomendada. O uso adicional de uma cepa conhecidamente sensível é recomendado. A resistência é reconhecida quando a redução da contagem de vermes é menor do que 90%.

Coles *et al.* (1992) trabalhando num guia da World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology – W.A.A.V.P. Determinaram que no FECRT em bovinos, deve-se usar grupos de pelo menos 10 animais, utilizar um período de 10 a 14 dias p.t. para a coleta das fezes e que a redução menor do que 90% deve ser associada com resistência.

Segundo Cutullé *et al.* (1999), a resistência só é percebida quando o produtor relata uma pobre reposta clínica posterior ao tratamento. Contudo, isso pode ocorrer devido a outros fatores como má administração, subdosagem, escolha errada do tipo de anti-helmíntico. Comparando os métodos de diagnóstico da resistência esses autores afirmam que dos métodos *in vivo* o FECRT é o mais difundido e usado no mundo. Afirmam ainda que as provas *in vitro* custam menos, pois não há a manutenção dos animais. Entretanto, como desvantagem

existe a manutenção de cepas sensíveis e resistentes em laboratório, utilização de técnicos mais capacitados e a limitação de se trabalhar com uma espécie de cada vez. Desse modo, geralmente são utilizadas somente para pesquisas e não como rotina no campo.

Melo *et al.* (2002) compararam dois testes práticos para detecção de resistência anti-helmíntica. Trabalhando com oxfendazol em ovinos, esses autores demonstraram que o teste de eclosão de ovos - TEO, acusou 62% de fazendas resistentes, com DL50 entre 0,01 e 0,32 µg/mL e o teste de redução de ovos de helmintos nas fezes – 76%. Foi ainda observado que não há correlação entre o TEO e FECRT. Os testes funcionam de maneira satisfatória somente quando ocorre uma população de helmintos resistentes maior do que 25%. Contudo, para o gênero *Haemonchus* o FECRT apresenta uma boa correlação.

Marcadores moleculares podem ser utilizados para detectar a resistência em estágio inicial. El-Abdellati *et al* (2007) verificaram a mutação L256F no gene GluCl α 3 em isolados de *C. oncophora*, como marcador para resistência. Os autores verificaram se este mesmo polimorfismo está presente em diferentes estirpes. Para isso, foram analisados, através de PCR amplificado, a região GluCl para a ocorrência de L256F em 17 indivíduos L3 resistentes e 17 susceptíveis. Nessa avaliação, nenhum verme; nem resistente, nem susceptível; apresentava a mutação L256F. Contudo, foram observados polimorfismos silenciosos perto da região analisada, o que direcionou a pesquisa para desenvolver um método para avaliar essa região em um grande número de larvas simultaneamente.

2.4.3 Resistência aos anti-helmínticos em bovinos.

Coles (2002) afirma que para se compreender porque a resistência anti-helmíntica é mais comum em ovinos do que em bovinos, tem-se que conhecer as diferenças de gerenciamento e das práticas de controle, entre ovinos e bovinos e entre

gado de corte e gado de leite. O potencial para o desenvolvimento para resistência depende da frequência de genes para resistência da população de vermes não submetidos à seleção, da genética da resistência, da adaptação dos vermes resistentes e, o mais importante, da população de vermes em refúgio. Discriminando os motivos pelo qual a resistência em bovinos não é um problema como em ovinos, o autor relata a diferença na biologia do parasito. Por exemplo, *Ostertagia ostertagi* sobrevive apenas um curto período no bovino, 25-50 dias, já *Haemonchus contortus*, em ovinos, pode sobreviver vários meses, dando grande vantagem aos vermes resistentes de produzirem uma próxima geração. Com relação ao hospedeiro, uma importante diferença entre ovinos, caprinos e bovinos é o desenvolvimento da imunidade aos nematóides, e como consequência, a frequência de tratamentos e a porcentagem de animais tratados. Caprinos desenvolvem baixos níveis de imunidade contra nematóides. Dessa forma, animais jovens e adultos necessitam de tratamentos anti-helmínticos. Ovinos adultos desenvolvem um alto nível de imunidade quando comparados aos caprinos. O tratamento em ovinos adultos, mesmo contra *H. contortus*, pode não ser essencial, mas é amplamente praticado. No caso dos bovinos, os animais jovens expostos aos vermes desenvolvem resistência e ao chegar a fase adulta não necessitam de tratamentos, embora os tratamentos contribuam com o aumento de produtividade. Devido a este fato a maior diferença entre os três grupos animais é a porcentagem de animais, e dos vermes, que são submetidos aos tratamentos. Analisando o manejo dos bovinos nas regiões temperadas, o autor demonstra que existem quatro tipos diferentes de manejo, com diferentes efeitos na dinâmica da população de nematóides. Criação extensiva - geralmente em regiões com pouca chuva e baixa densidade animal. Poucos tratamentos por anos são realizados e não há problemas com resistência. Rebanhos de cria - a maior parte da ingestão do pasto, e das larvas, ocorre pelo adulto que produzem relativamente poucos ovos. Nesse cenário, onde ocorre a diluição

dos genes da resistência, poucos tratamentos são dados aos bezerros e nenhum aos adultos. Não se espera que a resistência seja um problema. Contudo, em regiões onde se utiliza as lactonas macrocíclicas nos animais adultos para combate aos carrapatos, como na América do Sul, os nematóides são regularmente expostos aos anti-helmínticos. Reposição de fêmeas leiteiras - bovinos jovens são separados das mães e recriados em pastos que podem ser frequentemente ocupados a cada ano. A resistência pode se desenvolver após tratamentos sucessivos. Mas se estes pastos são diferentes a cada ano a resistência pode não ser favorecida. Criação intensiva de bezerros de corte - bezerros jovens frequentemente oriundos de rebanhos leiteiros ou bezerros machos ou fêmeas de cruzamentos de gado de corte são criados longe dos adultos. Para maximizar o crescimento tratamentos anti-helmínticos podem ser administrados frequentemente ajudando a contaminar os pastos com formas sobreviventes dos tratamentos. Esta é a principal causa de resistência às lactonas macrocíclicas em espécies de *Cooperia* encontradas em 16 de 18 fazendas na Nova Zelândia. Além disso, o autor relata sobre a frequência de genes da resistência em uma população não selecionada, afirmando que não existe essa informação disponível sobre qualquer população de nematóides. Além de ser muito difícil, hoje em dia, encontrar uma população que não tenha sido exposta a algum anti-helmíntico. A frequência do gene para resistência também pode variar entre as espécies de nematóides de bovinos. *Cooperia* é o gênero, em bovinos, que apresenta a dose limite para as lactonas macrocíclicas. Então, se espera que este seja o gênero que primeiro se apresente resistente. Sobre a genética da resistência o autor escreve que não tem sido realizadas pesquisas em bovinos. Mas o que se sabe é que a resistência às lactonas macrocíclicas parece ser dominante. Neste caso, se espera que os heterozigotos e os homozigotos dominantes sobrevivam ao tratamento. Ainda analisando a genética da resistência, o autor faz considerações sobre a adaptação dos vermes resistentes. Ele conceitua que a adaptação inclui a

habilidade de se desenvolver e sobreviver na pastagem, a habilidade de subir na pastagem e ser ingerido, sobreviver no hospedeiro, a taxa de ovipostura e a persistência no hospedeiro como adulto ou larva inibida. *Haemonchus contortus* resistentes aos benzimidazóis demonstraram ser mais adaptados do que os susceptíveis. Não se sabe ainda se nematóides resistentes ao levamisol e às lactonas macrocíclicas são mais adaptados do que os susceptíveis. Estirpes de *Cooperia* resistentes parecem ser mais patogênicas do que as susceptíveis, além de serem mais persistente do que isolados de laboratório susceptíveis. Com relação ao número de nematóides em refúgio, é considerado que eles podem vir de três fontes: Pasto, animais não tratados e formas inibidas que sobrevivem ao tratamento no hospedeiro. A estratégia de tratar os animais e mudá-los para uma pastagem descontaminada era recomendada no passado. Hoje se sabe que isso permite a ocupação do pasto por larvas sobreviventes ao tratamento e selecionadas para resistência. Na região temperada uma tática, muito popular, é a de prevenir o crescimento da população de nematóides no verão com vermífugos de liberação lenta tipo "bolus" ou tratamentos anti-helmínticos espaçados administrados até o fim da primavera. Isso deveria selecionar para resistência, mas aparentemente não o faz. A razão está porcentagem dos animais tratados. Do mesmo modo como ocorre com bezerros de gado de leite que são tratados em pastos que foram ocupados por bezerros não tratados do segundo ano ou por animais mais velhos. Esses são, na opinião do autor, os principais motivos pelo qual a resistência não é comum nos bovinos. Se existem estágios que não respondem à terapia, isso pode ajudar a retardar o aparecimento da resistência. Isso pode explicar porque em bovinos, na Nova Zelândia, a resistência ao levamisol aparece mais lentamente que a lactonas macrocíclicas e aos benzimidazóis. O levamisol é menos eficiente contra formas imaturas, como as de *O. ostertagi*. O autor chama atenção para os poucos levantamentos que têm sido realizados para se verificar casos de resistência.

2.4.3.1 Relatos Internacionais

Eagleson e Bowie (1986) foram um dos pioneiros em relatar helmintos resistentes em bovinos. Trabalhando na província de Vitória, Austrália, os autores observaram que após o tratamento com oxfendazol os animais apresentavam sintomas de infecção por helmintos. Inclusive com morte de dois animais. O material coletado destes animais foi utilizado para infectar 18 bezerros livres de helmintos. Esses animais foram infectados com 25.000 larvas cada. Sendo, 80% *Trichostrongylus axei* e 20% *Ostertagia ostertagi*. Três grupos foram formados com seis animais cada: controle, oxfendazol e abamectina. Os animais foram necropsiados 14 a 15 dias após o tratamento. Foi observado que o tratamento com abamectina foi eficiente contra as duas espécies parasitas. O oxfendazole foi altamente eficaz contra *O. ostertagi* - 98,7%. Contudo, a baixa eficácia de 13,2% contra *T. axei* demonstrou que essa espécie de helminto era resistente ao tratamento contra oxfendazol.

Geerts *et al* (1987) trabalharam com bovinos em fazenda localizada em Merchtem, na Bélgica, com infecção por *Ostertagia ostertagi* e histórico de uso de levamisole há 10 anos. Os autores realizaram três avaliações: o FECRT, o teste *in vitro* de paralisia larval e um teste controlado. No FECRT foram usados dois grupos, um tratado com levamisole e outro tratado com fenbendazole. O teste controlado foi realizado com apenas um bezerro traçador, que foi estabulado e tratado com levamisole. Quatro dias após o tratamento o animal foi necropsiado e os parasitos foram recuperados. Os resultados do FECRT demonstraram eficácia de 100% do fenbendazole, enquanto que a eficácia do levamisole foi no máximo 66,6%. No teste de paralisia larval demonstrou um fator de resistência de 2,7 e 10,9 para LC₅₀ e LC₉₅, respectivamente. Os autores concluíram que o isolado Merchtem de *O. ostertagi* pode ser considerado resistente ao levamisole.

Jackson *et al* (1987) relataram isolados de *Cooperia oncophora* resistentes aos

benzimidazóis na Nova Zelândia. Os autores realizaram FECRT em 30 bezerros separando-os em três grupos: controle, levamisole e oxfendazole. As avaliações fecais foram realizadas no dia do tratamento e sete dias depois. Dois animais foram utilizados para infecção experimental e tratamento com oxfendazol. No FECRT a redução do OPG levamisole foi de 100%. Contudo, a eficácia do oxfendazol foi de apenas 18,5%. A espécie recuperada na infecção experimental foi a *Cooperia oncophora*.

Na Nova Zelândia, Bisset *et al* (1990) trabalharam com doze bezerros previamente infectados de forma natural com parasitos. Os animais foram confinados uma semana antes do tratamento tóxico com ivermectina. Dois grupos foram formados, um grupo tratado com ivermectina e outro controle. Os animais foram necropsiados nos dias 14 e 15 após o tratamento. Utilizando a média geométrica, os autores observaram as seguintes taxas de eficácia: *Ostertagia* sp. - 99,6%, *Trichostrongylus axei* - 95,1%, *Oesophagostomum radiatum* - 100%. A eficácia contra *Trichuris ovis* foi de 78,7%; e contra as formas adultas de *Cooperia* sp. foi de 23,1%. Os autores observaram que a baixa eficácia contra *T. ovis* carece de importância, já que o para aquele país sua presença como parasitismo clínico é rara. A baixa eficácia contra a *Cooperia* sp. foi interpretada como uma característica inerente ao helminto. Segundo os autores, isso é explicado pela característica da *Cooperia* sp. ser um gênero de dose-limite para ivermectina. Não foi considerado como um caso de resistência porque não havia histórico de uso de ivermectina na fazenda estudada.

Na Nova Zelândia, McKenna (1991) realizou FECRT entre 1989 e 1991 em quatro fazendas. Utilizando grupos de 8 a 15 animais o autor observou eficácias entre 49% e 90% em bovinos tratados com benzimidazóis. O autor relata que esses foram casos de resistência confirmados.

Watson *et al.* (1995) desenvolveram um experimento em uma fazenda de cria de

bovinos de leite para o abate corte Nova Zelândia, onde havia relatos de evidências de falha da eficácia de ivermectina injetável e tópica. Os autores realizaram FECRT com 14 bezerros distribuídos em quatro grupos de acordo com contagem fecal, sendo: Controle, oxfendazole, moxidectina e ivermectina. Amostras fecais foram colhidas no dia 0, 9 e 12. O OPG dos grupos variou de 725 a 1005, no dia 0, e de 194 a 1200, no dia 12. O OPG do grupo controle, no dia 0 e 12, foi de 1005 e 1200, respectivamente. Os percentuais de redução de OPG foram, no dia 12, de 83,8%; 82,9% e 65,8%, para oxfendazole, moxidectina e ivermectina, respectivamente. *Cooperia* sp. foi o gênero dominante. Os resultados demonstraram resistência para as bases testadas e uma resistência lateral entre moxidectina e ivermectina, já que a moxidectina não havia sido utilizada na fazenda.

McKenna (1996) observa o crescimento dos casos de resistência na Nova Zelândia, analisando 13 casos de resistência aos benzimidazóis identificados por FECRT, conduzidos pelos Laboratórios de Saúde Animal Batchelar e Ruakura e realizados entre os anos de 1993 e 1995. Os gêneros observados foram na maioria *Cooperia* sp., além de *Ostertagia* sp. e *Trichostrongylus* sp. Com o percentual de redução abaixo de 90% foram 11 casos. Outros dois com percentual acima de 90%, sendo um com 90% e outro 93%. Apesar das diferenças com o rebanho ovino com relação à resistência anti-helmíntica, o autor afirma que, na época, havia razões para acreditar que a resistência em bovinos seria mais disseminada no futuro, já que era observado um crescimento da produção de bovinos de leite para produção de carne, e proporcionalmente uma grande expansão no mercado de anti-helmíntico bovino.

Em uma fazenda na Nova Zelândia onde já sido demonstrada resistência contra ivermectina, moxidectina e oxfendazole em *Cooperia* sp., Vermunt *et al* (1996) realizaram testes controlados para avaliar a eficácia de moxidectina e doramectina. Os autores trabalharam com 20 bezerros desmamados. Os animais foram tratados com levamisole oral para eliminar as

infecções presentes. Os bovinos foram então colocados nos mesmos pastos onde haviam sido identificados os helmintos resistentes. Após as contagens de OPG atingirem um patamar ideal para a realização de FECRT, os animais foram separados em dois grupos: tratados com ivermectina e com oxfendazol. No dia 21 p.t. os animais foram tratados com doramectina. Finalmente, no dia 42 p.t. os animais receberam levamisole. Exames OPG foram realizados nos dias 6, 14, 21, 28, 35, 42 e 56 p.t. No grupo tratado com ivermectina a redução de OPG foi de 87%, 41% e 13%, para os dias 6, 14 e 21 p.t., respectivamente. As reduções do grupo com oxfendazole foram 98%, 96% e 84%, para os dias 6, 14 e 21 p.t., respectivamente. Após o tratamento com doramectina as reduções de OPG foram: 86%, 27% e 0%, nos dias 7, 14 e 21 p.t., respectivamente. O tratamento final com levamisole demonstrou 100% de eficácia. Nas coproculturas após os tratamentos o gênero presente foi *Cooperia* sp. Os autores realizaram um segundo estudo em outra fazenda. Nessa ocasião 59 bovinos de corte de oito meses de idade, com infecções naturais de helmintos, foram alocados em quatro tratamentos: grupo ivermectina com 16 animais, grupo moxidectina com 16 animais, grupo doramectina com 15 animais e grupo ivermectina *bolus* com 12 animais. No dia 28 p.t. os animais do grupo ivermectina e moxidectina foram tratados com doramectina. No dia 49 p.t. todos os grupos foram tratados com levamisole. Exames de OPG foram realizados 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 60 p.t. As eficácias da ivermectina foram 97%, 65% e 40%, para os dias 7, 14 e 21 dias p.t., respectivamente. O tratamento com doramectina reduziu as contagens de OPG em 83% e 90% nos dias 14 e 21 p.t., respectivamente. Os animais tratados com moxidectina tiveram seu OPG reduzido em 79%, 51% e 46% nos dias 7, 14 e 21 p.t., respectivamente. O tratamento com ivermectina *bolus* foi altamente efetiva em controlar as infecções pelo período de sete semanas que foi avaliado. O tratamento final com levamisole reduziu as contagens de OPG em 100%. Somente helmintos do gênero *Cooperia* foram recuperados após

os tratamentos. De acordo com os resultados os autores afirmam que esses isolados de *Cooperia* sp. estudados são resistentes à ivermectina. Além disso, os resultados indicam que doramectina e moxidectina podem ser ineficazes contra estes isolados.

Trabalhando no Reino Unido, Coles *et al* (1998) utilizaram larvas de amostras oriundas de fazenda de bovinos com histórico de ineficácia à ivermectina. As larvas foram inoculadas em oito bezerros livres de verminose, após 28 dias os bezerros foram separados em dois grupos baseados na contagem de OPG. Um grupo foi mantido como controle e o outro foi tratado com ivermectina injetável na dose recomendada. Após 35 dias a redução do OPG foi de apenas 44%. Contudo, à necropsia não foi observada diferença na quantidade média de vermes dos animais tratados e controle.

Trabalhando com um rebanho bovino com histórico de pobre resposta clínica ao tratamento com ivermectina na Argentina, Anziani *et al.* (2000) montaram seis grupos de 12 animais cada, sendo: ivermectina 3,15%, ivermectina 1%, doramectina 1%, moxidectina 1% e grupo controle. O exame de ovos por grama de fezes nos grupos oscilou entre 228 a 256 OPG. Na coprocultura o único gênero encontrado foi *Cooperia*. Após 12 dias do tratamento, um novo exame OPG mostrou que a eficácia de todos os produtos foi abaixo de 75%, exceto moxidectina que obteve resultado acima de 90%. Trinta e sete dias após o início do experimento fez-se novos grupos, oxifendazol 5%, levamisole e controle, onde os exames de ovos por grama de fezes oscilaram entre 688 a 786 OPG. Passados 11 dias após o tratamento verificou-se que a eficiência das duas bases foi de 100%. Os autores concluíram que havia resistência para ivermectina, doramectina e suspeita de resistência para moxidectina nas amostras estudadas.

Leathwick *et al* (2000) realizaram estudo na Nova Zelândia para confirmar o nível de resistência à ivermectina de um isolado de *Ostertagia circumcincta* e avaliar sua

sensibilidade a outras lactonas macrocíclicas. Os autores utilizaram 31 ovinos sem infecções por nematóides parasitos. Foram selecionados 25 animais que receberam 6.000 L3 de isolados suspeitos de resistência, enquanto 6 animais receberam L3 de isolado sensível à ivermectina. Após o estabelecimento da infecção, os animais foram separados da seguinte forma: Grupo controle - seis animais infectados com isolado resistente, grupo ivermectina - seis animais com isolados resistentes e 2 animais com isolados sensíveis, grupo moxidectina - seis animais com isolados resistentes e 2 animais com isolados sensíveis e grupo abamectina - sete animais com isolados resistentes e 2 animais com isolados sensíveis. Exames de OPG foram avaliados sete e 10 dias após o tratamento e no dia 10 p.t. os animais foram necropsiados. Nos resultados todos os tratamentos foram 100% eficazes contra os isolados sensíveis. O grupo com ivermectina apresentou eficácia de apenas 18% no FECRT e de 42% no teste com necropsia. Entretanto, os grupos com moxidectina e abamectina apresentaram os seguintes resultados: FECRT - 100% e 92,2%, respectivamente; teste controlado - 99% e 96%, respectivamente. Os autores verificaram que a resistência foi constatada para ivermectina, mas não para moxidectina e abamectina.

Fiel *et al.* (2001) trabalhando na Argentina com bovinos de nove a 11 meses de idade, avaliaram a resistência de *Cooperia* sp. à tratamentos com avermectinas e fenbendazole, com FECRT e necropsia. Nos resultados das necropsias, esses autores descrevem uma eficácia contra este parasito de apenas 62,7% e 48% para ivermectina e ivermectina L.A., respectivamente. No FECRT, realizando as contagens de OPG no dia do tratamento e 14 após o tratamento, foram encontrados os seguintes dados de eficácia: 65%, menos 20%, 85%, 95% e 100%, para ivermectina, ivermectina L.A., doramectina, moxidectina e fenbendazole, respectivamente. De acordo com esses resultados, os autores concluíram que há resistência do parasito estudado para a base ivermectina, suspeita

de resistência para doramectina. Fenbendazole e moxidectina demonstraram boa eficácia, sendo alternativas para o controle dessas cepas.

Na Venezuela Coronado *et al.* (2003) separaram 26 novilhas com infecções naturais por helmintos de acordo com a contagem de OPG. Dois grupos foram formados, um grupo, com 18 animais, foi tratado com ivermectina formulada à base de óleo, oito animais permaneceram sem tratamento como controle. Após o primeiro tratamento, foi realizado um outro 28 dias depois. No dia zero e 56 após o primeiro tratamento foram realizadas as contagens de OPG. Como as contagens permaneciam altas, foram separadas 10 novilhas com as maiores contagens de OPG para um FECRT. O tratamento do FECRT foi realizado 62 dias após o primeiro tratamento, sete dias depois foi avaliado o OPG. Na avaliação do dia 56 a contagem do grupo tratado aumentou 5% quando comparado ao dia zero. Na avaliação realizada no FECRT a redução foi de 40,81%. Na coprocultura a prevalência de *Cooperia* sp. foi 95% dos gêneros presentes.

Na Índia, Alka *et al* (2004) verificaram a sensibilidade de *Trichostrongylus colubriformis* resistentes à ivermectina ao tratamento com abamectina oral e injetável. Para isso, eles trabalharam com 24 ovinos jovens sem infecção com helmintos. Cada animal foi infectado com 10.000 L3 *T. colubriformis* sabidamente resistentes à ivermectina. Transcorridos 24 dias após a infecção, os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com a contagem de OPG: grupo controle, grupo tratado com ivermectina oral, grupo tratado com abamectina oral e grupo tratado com abamectina injetável. Exames OPG foram realizados nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 p.t. Todos os animais foram necropsiados no dia 10 p.t. para avaliar a carga parasitária. A taxa de estabelecimento da infecção nos ovinos foi de 46% após a infecção de 10.000 larvas de *T. colubriformis*. Os resultados da redução de OPG utilizando a média aritmética, nos dias 3, 5, 7 e 10 p.t., foram os seguintes: para o tratamento com

abamectina oral - 77%, 97%, 98,6% e 98%; abamectina injetável - 76%, 79%, 81% e 76% e ivermectina oral - 68%, 70,5%, 72% e 66%, respectivamente. Estatisticamente, as contagens de OPG do grupo controle não foram diferentes dos grupos tratados com abamectina injetável e ivermectina oral, mas foram diferentes do grupo tratado com abamectina oral. No teste controlado a redução da carga parasitária foi de 63%, 97% e 74% para ivermectina, abamectina oral, abamectina injetável, respectivamente. Estatisticamente, a contagem da carga de vermes foi menor na abamectina oral do que os demais grupos, que, por sua vez, não diferiram entre si. Os autores afirmam que a diferença entre as eficácias da abamectina oral e a ivermectina, se deve as diferenças entre as estruturas químicas e as farmacocinéticas dos dois fármacos. Entretanto, o fato da abamectina oral ser superior à abamectina injetável, segundo os autores, se deve às diferenças ainda não explicadas na farmacocinética das formulações.

Na Argentina, Anziani *et al* (2004) avaliaram a resistência simultânea à ivermectina e benzimidazóis em bezerros naturalmente infectados por *Cooperia* e *Haemonchus*. Os autores trabalharam com uma fazenda que, apesar do uso de vermífugos, apresentava histórico de más condições de ganho de peso. Nesta propriedade foram escolhidos 12 bezerros com o pior estado nutricional, edema e diarreia. Os animais foram pesados, marcados e divididos em dois tratamentos de seis animais cada. Grupo tratado com ivermectina e outro com albendazole. Exame OPG foi realizado no dia do tratamento e uma semana depois. Como não houve resposta ao tratamento, foram selecionados 40 animais para FECRT. Foram montados quatro grupos de dez animais cada. Grupo controle, tratado com ivermectina 1%, ricobendazole e levamisole. Foram realizados OPG no dia do tratamento e dez dias p.t. Os resultados de eficácia foram: Ivermectina 1% - 13%, ricobendazole - 9% e levamisole - 100%. O OPG inicial variou de 180 - 2800. Um animal do grupo da ivermectina morreu dois dias após tratamento com OPG 2400. A coprocultura do dia 10 p.t. apresentou as

seguintes prevalências: Ivermectina - 92% *Haemonchus* e 8% *Cooperia*; ricobendazole - 95% *Haemonchus* e 5% *Cooperia*.

Fiel *et al* (2004) trabalharam com novilhos no sul de Córdoba, Argentina, em fazenda que realizava uso mensal de vermífugo nos últimos oito anos, alternado lactonas macrocíclicas e benzimidazóis. Os autores realizaram FECRT utilizando grupo controle e necropsia. Os resultados de eficácia foram: grupo tratado com ivermectina 1% - 73%; fenbendazole - 49,1%; Levamisole/fosfamisol - 90,4%. Na necropsia, comparando com o grupo controle as eficácias foram: ivermectina 1% - *Cooperia* 22,6% e *Haemonchus* 76,1%; fenbendazole - *Cooperia* 24,2%, *Haemonchus* 28,3% e *Oesophagostomum* 0%; e levamisole - *Ostertagia* 65%.

Gasbarre *et al* (2004) realizaram FECRT nos Estados Unidos da América. Os grupos trabalhados foram: Controle, ivermectina, moxidectina pour on, doramectina injetável, eprinomectina pour on e albendazole oral. Nenhum tratamento alcançou pelo menos 80% de eficácia. Os autores necropsiaram três animais de cada grupo, sete dias após o tratamento. Os resultados foram, para total de helmintos e porcentagem de *H. placei* e *H. contortus*, respectivamente: Controle - 582, 29% e 71%; ivermectina injetável - 2616, 28% e 72%; moxidectina pour on - 1950, 33% e 67%; doramectina injetável - 2034, 27% e 73%; eprinomectina pour on - 2019, 45% e 55%; e albendazole oral - 2291, 0% e 100%. Também foram encontradas espécies de *Cooperia*. Os resultados foram, para total de helmintos, porcentagem de *C. punctata*, *C. oncophora* e *C. spatulata*, respectivamente: Controle - 242, 89%, 0% e 11%; ivermectina injetável - 11875, 90%, 8% e 2%; moxidectina pour on - 5308, 96%, 0% e 4%; doramectina injetável - 6482, 86%, 10% e 3%; eprinomectina pour on - 3712, 85%, 2%, 13%; e albendazole oral - 17, 100%, 0% e 0%. Os autores observaram que os resultados suportam que foi encontrado *H. contortus* resistentes a ambas as avermectinas e ao albendazole. Além de *H. placei* e *Cooperia* sp. resistentes às avermectinas mais comumente usadas.

Suarez e Cristel (2005) analisaram 22 rebanhos, que totalizavam mais de 900 bovinos, na Argentina através de FECRT. Quatro grupos foram analisados: ivermectina 0,2mg/kg, fenbendazole 5mg/kg, levamisol 7,5mg/kg e controle. As eficácias médias foram 79,8%; 94,6% e 97,4%; respectivamente. Resistência para ivermectina foi observada em 13 rebanhos e a resistência para fenbendazole e ivermectina foi observada em 4 rebanhos. Não foi observada resistência para levamisol. *Cooperia* foi o gênero predominante nos casos de resistência à ivermectina. *Ostertagia* foi observada em um rebanho com resistência à ivermectina e foi o gênero predominante nos rebanhos com resistência ao fenbendazole. Em um rebanho resistente à ivermectina foi observado o gênero *Haemonchus*. Os autores concluíram que o nível de resistência à ivermectina é alto, e que muitas fazendas apresentam resistência ao fenbendazole.

Mcarthur *et al* (2005), na Nova Zelândia, realizaram teste controlado comparativo com eprinomectina pour-on (Eprinex[®], Merial), abamectina pour-on (Genesis[®], Ancare), levamisol (Levipor[®], Novartis) pour-on e uma combinação de abamectina e levamisol pour-on (Eclipse[®], Ancare). Os animais utilizados tiveram origem em uma propriedade de exploração intensiva com uso de lactonas macrocíclicas há cinco anos. A investigação foi iniciada quando o proprietário relatou uma baixa eficácia nos produtos utilizados. Foram utilizados 30 bezerras que foram separados em grupos tratados e um grupo controle. Os animais foram sacrificados de sete a 10 dias após o tratamento. Usando a média aritmética, os autores observaram que a eficácia para *Cooperia* sp. e *Trichostongylus longispicularis* foram 78,6%, 75,7% para abamectina, e 70,9% e 80,8% para eprinomectina, respectivamente. A eficácia do levamisol para *Ostertagia* e *T. axei* foi de 56,6% e 80,3%, respectivamente. A associação abamectina e levamisol demonstrou eficácia acima de 98% para *Ostertagia*, *T. axei*, *Cooperia*, *Oesophagostomum* e *Trichuris*. A eficácia da associação de drogas para *T.*

longispicularis foi de 93%. Dessa forma, os autores registraram o primeiro caso de resistência de *T. longispicularis*, e talvez o primeiro caso de resistência às lactonas macrocíclicas por mais de uma espécie parasita, em bovinos, na Nova Zelândia. Os dados também comprovaram a eficácia da combinação de drogas contra os helmintos resistentes.

Gasbarre e Smith (2007) relataram nematóides de bovinos multi-resistentes nos Estados Unidos. Os autores monitoraram durante dois anos com FECRT e necropsias. Os produtos testados foram: ivermectina injetável, moxidectina pour-on, doramectina injetável, eprinomectina pour-on, albendazole oral, fenbendazole, levamisol e duas combinações, uma com eprinomectina mais levamisol e outra com eprinomectina mais fenbendazole. Somente os tratamentos que incluíam levamisol na formulação, em combinação ou não, apresentaram pelo menos 80% de redução de OPG. Os resultados em ambos os anos foram similares. Foi encontrado *Haemonchus contortus* resistente às lactonas macrocíclicas e aos benzimidazóis. Contudo, *H. similis* era susceptível aos benzimidazóis. Poucas *Ostertagia ostertagi* foram observadas nos estudos, e elas eram restritas aos animais tratados com levamisol. Foi também encontrada *Cooperia punctata*, poucas *C. oncophora*, e *C. spatulata* que eram resistentes às lactonas macrocíclicas.

Na Argentina, Suarez e Cristel (2007) avaliaram a eficácia de anti-helmínticos contra nematóides gastrintestinais, comparando a fórmula Coles e a fórmula Presidente para estimativa da eficácia da redução. Foram selecionados 25 rebanhos com histórico de resistência que foram divididos em 11 rebanhos de engorda, 11 rebanhos de engorda e cria e três rebanhos de cria. Foram levantadas informações sobre as propriedades com questionários. No FECRT foram utilizados quatro grupos com 15 animais cada. Grupo tratado com ivermectina, benzimidazóis, levamisole e controle. As fazendas apresentaram média de 4280 ha, com 6760 bovinos. Todas utilizavam anti-helmínticos pelo menos uma

vez por ano e em média 3,28 vezes por ano. O número de tratamentos em fazenda com resistência foi maior - quatro por ano - do que as fazendas sem resistência - 1,89 por ano. Utilizando o FECRT foi encontrada resistência anti-helmíntica em 16 fazendas - 64% das propriedades estudadas. A eficácia média nestas fazendas foi: ivermectina - 81,0%, benzimidazóis - 93,3% e levamisole - 97,6%. A eficácia média nos grupos tratados com ivermectina, nas fazendas que apresentaram resistência à esta base, foi de 71%. Não foi detectada resistência para levamisole. Considerando todas as 25 fazendas, houve alta correlação entre os dois métodos para calcular a eficácia dentro dos grupos. Os autores verificaram que ambos os métodos deram resultados similares nas nove fazendas sem resistência. Contudo, nas fazendas que apresentaram resistência houve baixa correlação entre os métodos. Os motivos dessa diferença foi que, nesses casos, os valores de OPG do grupo controle pré- e pós-tratamento aumentaram ou diminuíram muito entre as observações, ou havia grande diferença no OPG pré-tratamento entre os grupos. Dos gêneros encontrados, após o tratamento, em 15 fazendas com resistência à ivermectina, *Cooperia* apresentou a maior prevalência - 98,5%. Nas fazendas com resistência aos benzimidazóis, *Ostertagia* foi o gênero mais prevalente - 97,5%. Os autores concluíram que a região estudada mostrou a alta prevalência para resistência anti-helmíntica. Foi observado também que a prevalência das fazendas resistentes ao benzimidazóis foi menor do que as de resistentes à ivermectina. Porém a presença do gênero mais patogênico exacerbou a gravidade da situação de resistência contra os benzimidazóis. Além disso, a prevalência da resistência encontrada no trabalho é grave também porque 28% das fazendas apresentaram resistência multigênero - *Cooperia* e *Haemonchus* e multidroga - ivermectina e benzimidazóis.

2.4.3.2 Relatos Nacionais

No Rio Grande do Sul, Pinheiro e Echevarria (1990) avaliaram 16 bezerros através do exame OPG e separaram quatro

grupos. Cada grupo foi submetido a um tratamento: oxfendazole 2,5mg/kg, albendazole 5mg/kg, albendazole 7,5mg/kg e controle. Os animais foram necropsiados sete dias após o tratamento. Os helmintos encontrados com maior prevalência foram: *Haemonchus*, *Cooperia* e *Ostertagia*. Em menor quantidade foi encontrado *Trichostrongylus axei*. A eficácia de todos os tratamentos foi acima de 90% para *T. axei*, *Ostertagia* sp. e *Cooperia* sp. A eficácia contra *Haemonchus* sp. do Albendazole 5,0 mg/kg, Albendazole 7,5 mg/kg e Oxfendazole 2,5 mg/kg foi de 81%, 88,5% e 60 %, respectivamente. Dessa forma, esse foi um relato de *Haemonchus* sp. resistente às bases avaliadas. Além disso, os autores submetem os fármacos à análise do princípio ativo e concentração. Observaram que os produtos não apresentavam alterações.

Paiva *et al* (2001) desenvolveram um teste de motilidade larval para determinar a sensibilidade de diferentes isolados de helmintos. Foram utilizados três isolados. Isolado Serramar oriundo de fazenda, localizada no estado de São Paulo, que utilizava ivermectina desde os anos 80 e com animais com apresentavam infecção natural sem tratamento há 90 dias. Desta propriedade foram selecionados 20 animais de maior OPG e coletadas fezes para realização de coprocultura e obtenção das larvas. Os outros dois Isolados foram oriundos de duas propriedades, fazenda Modelo e CNPGC, ambas localizadas no estado do Mato Grosso do Sul. Destas propriedades também foram obtida larvas, coletadas de dez bovinos de cada fazenda após a coprocultura. Foi utilizado como princípio ativo a Ivermectina 93% B1a. A base foi dissolvida em solução estoque de propilenoglicol 60% e glicerol 40% (v/v). O teste de sensibilidade foi realizado no meio de cultura sem o soro fetal bovino, submetendo a solução de ivermectina a várias diluições, em triplicata. A cultura, após a adição de ivermectina, foi incubada por 24 horas. Uma triplicata foi mantida sem ivermectina como controle e foram testadas duas concentrações somente com o solvente - propilenoglicol e glicerol. Para a contagem de larvas foram usadas duas

amostras por tubo de cada concentração - total seis amostras por concentração. Foram analisadas ao microscópio estereoscópio, sendo consideradas viáveis as larvas com movimento e mortas as sem movimento. O Fator de resistência (RF) foi calculado considerando a concentração efetiva (EC) resistente dividida pela EC isolado sensível. A prevalência dos gêneros foi: Serramar *Cooperia* - 71%, *Haemonchus* - 28% e *Oesophagostomum* - 1%. Isolado Modelo *Cooperia* - 75%, *Haemonchus* - 10% e *Oesophagostomum* - 15%. Isolado CNPGC, *Cooperia* - 55%, *Haemonchus* - 35% e *Oesophagostomum* - 10%. O solvente propilenoglicol mais glicerol não teve nenhum efeito sobre as larvas. Os RF dos isolados foram: Modelo - 1, CNPGC - 12,98 e Serramar - 57.786,08 hg/mL. Os autores concluíram que os isolados de *Cooperia punctata* e *Haemonchus placei* Serramar são resistentes à ivermectina.

Realizando a identificação de *Cooperia punctata* resistente a ivermectina e doramectina em bovinos no estado do Rio de Janeiro – Brasil, Cardoso *et al.* (2002) trabalharam com dois testes controlados. O primeiro teste foi com animais naturalmente infectados, com idade de um a quatro meses. Neste teste foram realizadas colheitas de fezes nos dias 0, 7 e 14 p.t. e realizados exames de OPG. Trinta e um animais foram divididos em três grupos e tratados com ivermectina injetável e 17 animais foram divididos em dois grupos e tratados com doramectina injetável. No segundo teste foi realizada infecção artificial e necropsia, trabalhando com os mesmos produtos. Os resultados da redução de OPG no teste 1, nos dias 7 e 14 foram: para ivermectina de 39,8% e 0%; 0% e 8,1%; 0% e 0%. Para doramectina os resultados foram: 65,2% e 60,4%; 30,3 e 32,3%, para observações aos 7 dias p.t e 14 dias p.t. No teste de infecção artificial o número de parasitos adultos recuperados na necropsia, realizada no dia 14 p.t., foram: para ivermectina de 53,9% e doramectina de 82,4%, sendo *Cooperia punctata* o único parasito recuperado. Segundo os autores, ficou comprovada a existência de uma população de *Cooperia punctata* resistente a ivermectina e doramectina.

Em um levantamento realizado em Santa Catarina, Souza *et al.* (2002), utilizando amostras de fezes de bovinos de sete meses a dois anos, realizaram o FECRT e encontraram 60% das propriedades resistentes à ivermectina, 30% ao fosfato de levamisole e 10% ao albendazole. A eficácia da ivermectina ficou entre 53,78 e 98,19%, levamisole 63,3 e 100% e albendazole 83,88 e 100%. Os gêneros encontrados na coprocultura após os tratamentos foram, para ivermectina *Cooperia* e *Haemonchus*, para levamisole foram *Ostertagia*, *Cooperia* e *Trichostrongylus* e para albendazole foi *Cooperia*. Esses autores concluíram que no rebanho estudado há resistência a esses anti-helmínticos.

Nascimento *et al.* (2003) trabalharam com 18 bovinos, separados em três grupos de acordo com a média das contagens de OPG realizadas nos três dias anteriores ao tratamento, uma amostra por dia. Um grupo permaneceu sem tratamento, como controle, outro grupo foi tratado com uma associação de ivermectina 2,25% e abamectina 1,25% (1 mL/50kg) e o terceiro grupo foi tratado com ivermectina 3,15% (1 mL/50kg). Exames de OPG foram realizados 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 dias após o tratamento. No dia 14 após o tratamento todos os bovinos foram necropsiados para coleta de amostras, quantificação e identificação das espécies parasitas. A redução de OPG no 13º dia foi de 100% para o grupo tratado com a associação de avermectinas e 69,33% para o grupo tratado com ivermectina 3,15%. Foram encontradas oito espécies de nematóides - *Cooperia pectinata*, *C. punctata*, *C. spatulata*, *Trichostrongylus axei*, *Oesophagostomum radiatum*, *Trichuris discolor*, *Haemonchus placei* e *Dictyocaulus viviparus*. Ambos os tratamentos eliminaram quatro dessas espécies - *C. pectinata*, *T. axei*, *O. radiatum* e *D. viviparus*. As eficácias da ivermectina 3,15% e da associação das avermectinas foram 33,09% e 98,61%; 75,56% e 97,69%; 84,79% e 98,84% para *T. discolor*, *C. punctata* e *C. spatulata*, respectivamente. Demonstrando baixa eficácia da ivermectina 3,15% e alta eficácia da associação de avermectinas. Contra *H. placei* ambos tratamentos não foram eficientes, sendo a

eficácia da associação de avermectinas de 89,64% e da ivermectina 3,15% de 30,98%.

Borges (2004) avaliaram a eficácia anti-helmíntica de ivermectina aplicada na dose de 630 µg/kg, em bovinos naturalmente parasitados. Três experimentos foram realizados no sul e um no oeste de Minas Gerais, outro experimento foi realizado no sul do Brasil. Em cada experimento foi utilizado um grupo controle e um tratado com seis animais cada. As eficácias foram: *H. placei* - 30,98%; 30,98%; 80,91%; 0,0% e 84,99%; *C. punctata* - 0,0%; 75,56%; 9,66%; 0,0% e 0,0%; *C. spatulata* - 0,0%; 84,79%; 0,0% e 86,15%; *C. pectinata* - 100%; 0,0%; 81,99% e 0,0%. Os autores consideraram resistentes os helmintos com eficácia abaixo de 90%.

Soutello *et al.* (2004) trabalharam na região Oeste de São Paulo e avaliaram 22 fazendas de bovinos naturalmente infectados, durante dois anos. Os autores realizaram FECRT avaliando a eficácia sete a dez dias após tratamento. Nos resultados foi observado que a eficácia da ivermectina 1% foi abaixo de 90% de eficácia em 20 fazendas. O albendazole apresentou eficácia acima de 90% em 17 fazendas e inferior a 90% em 5 fazendas. A eficácia do levamisole foi superior a 90% em 20 fazendas e 2 fazendas com 47,4% e 73,8% de eficácia, respectivamente. A eficácia da moxidectina 1% foi de 100% em 16 fazendas, as outras 6 fazendas o OPG variou entre 90% e 97,2%. Os autores encontraram os gêneros *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp. na coprocultura.

Souza *et al.* (2004) realizaram um levantamento no Planalto Catarinense com 25 propriedades de bovinos. Em cada fazenda foram coletadas 60 amostras que foram divididas em três grupos tratados com anti-helmínticos. Os grupos foram utilizados para realização de FECRT, avaliando a eficácia sete dias após o tratamento. Em 72% das fazendas foi observada resistência à ivermectina, 12% ao fosfato de levamisole e 4% ao albendazole. Em 24% propriedades todos os anti-helmínticos tiveram acima de 95%. Os gêneros encontrados na coprocultura foram: ivermectina - *Cooperia*

sp. e *Haemonchus* sp.; Levamisole - *Ostertagia* sp., *Cooperia* sp. e *Trichostrongylus*; e albendazole - *Cooperia* sp.

Rangel *et al* (2005) realizaram dois FECRT em um mesmo rebanho com bovinos naturalmente infectados, na região central de Minas Gerais. No primeiro teste Utilizaram-se quatro grupos: ivermectina 1%, ivermectina LA 1%, doramectina 1% e controle. No segundo teste os autores utilizaram três grupos: Moxidectina 1%, abamectina 1% e controle. O OPG foi realizado no dia do tratamento e 14 dias pós-tratamento. No primeiro teste foram observadas as seguintes taxas de eficácia: ivermectina 1%, -1,3%; ivermectina LA 1%, 18,9% e doramectina, 50,6%. Os gêneros de helmintos encontrados foram *Cooperia* e *Haemonchus*. No segundo teste as eficácias avaliadas de moxidectina 1% e abamectina 1% apresentaram eficácia acima de 99%.

Paes-Oliveira *et al* (2006) realizaram FECRT em novilhas 1/2 sangue Nelore e Angus. Foram montados cinco grupos de dez animais cada, com OPG médio de 259. A eficácia foi avaliada sete dias após tratamento. As eficácias foram: ivermectina 1,25%+Abamectina 2,25% - 67%; Moxidectina 1% - 100%; Ivermectina 3,15% - 13%; Ivermectina 1% + ADE + minerais - 63%. Dessa maneira, os autores constataram haver resistência contra todos os fármacos estudados exceto moxidectina.

Piacenti *et al* (2006) realizaram FECRT no estado de São Paulo, utilizando 40 animais, 20 para cada grupo. Os autores não utilizaram grupo controle. As eficácias avaliadas dez dias após tratamento, foram: Ivermectina - 62,72% e levamisol - 92,11%.

Soutello *et al* (2007) avaliaram a resistência anti-helmíntica em rebanhos bovinos na região noroeste do estado de São Paulo. Os autores avaliaram 25 fazendas de gado de corte, selecionando animais com maiores contagens de OPG e dividindo-os em quatro grupos tratados - Sulfóxido de Albendazole 15% (Ricobendazole[®], Fort Dodge), Fosfato de levamisole 18,8% (Ripercol[®], Fort Dodge), Moxidectina 1% (Cydectin[®], Fort

Dodge), ivermectina 1% (Ivomec[®], Merial) e um grupo controle. Como foram encontrados baixos valores de OPG, alguns grupos ficaram com menos de 10 animais, mas cada grupo ficou com, pelo menos, 5 animais. As amostras fecais foram coletadas sete a 10 dias após tratamento. Os autores consideraram como resistentes os resultados abaixo de 90% de eficácia. Quando a eficácia foi maior do que 90% (exceto para o valor de 100%) a fazenda foi considerado suspeita de resistência. De acordo com o levantamento realizado os tratamentos anti-helmínticos nas fazendas variaram de um a quatro por ano. A maioria das fazendas tratavam na época na vacinação contra febre aftosa, duas vezes por ano. Oito fazendas aplicavam anti-helmínticos três vezes por ano. A prevalência dos gêneros encontrados foram: *Cooperia* sp. - 67,4%; *Haemonchus* sp. - 22,6%; *Oesophagostomum* sp. - 8,5% e *Trichostrongylus* sp. - 1,5%. *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp. foram encontrados em todas as fazendas, enquanto que *Oesophagostomum* sp. e *Trichostrongylus* sp. foram encontrados em 24 e 11 fazendas, respectivamente. Resistência à ivermectina, redução abaixo de 90%, foi encontrada em 23 fazendas. Em 19 fazendas a eficácia da moxidectina foi 100%, nas outras seis a eficácia variou de 90% a 97,2%. A eficácia do albendazole foi de acima de 90% em 20 fazendas e abaixo de 90% nas outras cinco. Após o tratamento com levamisole 23 fazendas apresentaram eficácia acima de 90%, e em apenas duas a eficácia foi abaixo de 90%. Resistência múltipla foi encontrada em cinco fazendas. Somente duas fazendas apresentaram a eficácia acima de 90% para todos os tratamentos anti-helmínticos. Os autores afirmam que os resultados indicam resistência de *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp. a albendazole, levamisole e especialmente a ivermectina. Eles analisam ainda que em duas fazendas houve indicação de *Oesophagostomum* sp. resistente à moxidectina, e que isso deve ser comprovado através do teste controlado, já que o período de avaliação pós-tratamento de 7 a 10 dias pode não ser ideal para moxidectina e ivermectina, onde pode ocorrer somente efeito sobre a postura

de ovos sem haver destruição dos vermes. Desse modo, algumas fazendas do teste, susceptíveis à moxidectina, podem demonstrar resistência se as amostras fossem coletadas 14-17 dias após o tratamento.

2.5 INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO ARTIFICIAL SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Pesquisando a influência das helmintoses gastrintestinais no quadro hematológico de bezerros Jersey e Holstein, normais e acometidos com esofagostomose, Delaune (1939) observou nos animais infectados uma queda do número de hemácias, um aumento do número de leucócitos e um aumento de 17% dos neutrófilos, quando comparados com os animais normais.

Na Nigéria, Ross e Armour (1960) trabalharam com infecção experimental de *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp. e *O. radiatum*, em bezerros. Avaliando quinzenalmente o peso dos animais, a infecção helmíntica - através de OPG e coprocultura - e hematócrito, os autores concluíram que níveis de albumina no soro de 1,9 g/100ml, ou superior, e percentual do volume globular de 32%, ou menor, indicava efeito patogênico. A média de contagem de ovos de *Haemonchus* de 600 OPG, ou mais, associado ao valor de albumina citado, poderia estar relacionado com a patogenicidade da hemoncose.

Também trabalhando com infecção artificial, Bremner (1966) avaliou o quadro hematológico de bezerros. O autor trabalhou com quatro grupos, três grupos infectados com 50.000 larvas infectantes de *Haemonchus placei*, 7.500 de *Oesophagostomum radiatum* e 10.000 de *Bunostomum phlebotomum*, por bezerro, e um quarto grupo de bezerros não parasitados, mas com anemia crônica induzida através da extração de 200 a 500 ml de sangue diariamente. A concentração de hemoglobina e proteína total foram determinadas semanalmente. Foi observado que, em todos os grupos, havia uma diminuição da concentração da hemoglobina e relativa severidade no

declínio da concentração de proteína total no soro. O autor concluiu que, para uma dada queda na concentração da hemoglobina, a severidade do declínio da proteína total do soro seguia a seguinte ordem nos grupos: *O. radiatum* > *B. phlebotomum* > *H. placei* > anemia crônica induzida.

Novamente, Bremner (1970) trabalhou com *O. radiatum* e avaliou a perda de sangue nas fezes de 13 bezerros. O autor verificou que o sangramento dentro do cólon começou três semanas após a infecção, na ecdise da 4ª muda, persistindo por no mínimo nove semanas. A perda máxima de eritrócitos ocorreu durante a sétima semana após a infecção estando associada a carga parasitária. O autor concluiu que a hemorragia intestinal é a primeira causa da anemia associada à infecção por *O. radiatum*.

Harness *et al.* (1970) utilizaram três grupos de bovinos infectados com 50.000, 125.000 e 500.000 larvas infectantes (L3) de *H. placei*. As coletas de fezes foram semanais durante 14 semanas. Poucas alterações foram observadas entre os valores hematológicos dos animais do grupo controle e do grupo infectado com 50.000 L3. Nos animais infectados com 125.000 e 500.000 L3 houve diminuição dos níveis de hemoglobina e hematócrito, atingindo os menores índices na quarta a quinta semana após a infecção. Também houve diminuição significativa no número total de leucócitos, neutrófilos e linfócitos e aumento de eosinófilos no sangue periférico dos animais infectados. Segundo os autores, a redução dos níveis de neutrófilos e linfócitos estava associada à reação tissular ocorrida durante a infecção e não à ação do parasita.

Seifert (1971) observou o efeito da infecção natural por *Cooperia* sp., *Haemonchus* sp., *Oesophagostomun* sp. e *Trichostrongylus axei* em bezerros mestiços. O autor acompanhou o desenvolvimento dos animais do desmame ao vigésimo mês de idade. Foram feitas contagens de ovos por grama de fezes para avaliar a carga parasitária e observados os parâmetros hematológicos. Foi observada significativa

diminuição nos valores do hematócrito, concentração de hemoglobina e níveis de proteínas plasmáticas nos animais com helmintoses.

Viana e Campos (1974), compararam valores obtidos no hemograma de 36 bezerros, livres de helmintos gastrintestinais, com 50 animais da mesma raça e faixa etária, naturalmente infectados por dois a oito gêneros diferentes de helmintos – *Cooperia* sp., *Haemonchus* sp., *Oesophogostomum* sp., *Trichostrongylus* sp., *Bunostomum* sp., *Trichostrongylus* sp., *Strongyloides* sp., *Moniezia* sp. O gênero *Cooperia* foi o de maior prevalência, seguido, por ordem decrescente, de *Haemonchus*, *Bunostomum*, *Strongyloides*, *Moniezia* e *Trichostrongylus*. O total de parasitas oscilou de 93 a 37.012 por animal. Verificaram que os animais parasitados apresentaram, em relação aos não parasitados, diferenças estatisticamente significativas nos valores de eritrócitos, concentração hemoglobina, volume globular e número total de leucócitos. Os autores observaram anemia do tipo normocítica normocrômica. Entretanto, não houve variação significativa na contagem diferencial dos leucócitos.

Lima (1980) estudou as alterações dos valores de hematócrito e concentração de hemoglobina em quatro grupos de bezerros mestiços holandês x zebu, com seis a oito meses de idade, naturalmente infectados com helmintos gastrintestinais. Dois grupos foram tratados com cloridrato de tetramisol na dose de 5 mg/kg e 10 mg/kg de peso vivo, respectivamente; outro grupo foi tratado com fenbendazole na dose de 7.5 mg/kg de peso vivo e outro grupo foi o controle. Os tratamentos foram feitos no início e final do período chuvoso e época da seca. Foi observado que os valores do hematócrito e concentração de hemoglobina dos grupos tratados foram mais elevados do que os do grupo controle. A medida que melhoravam as condições das pastagens no período das chuvas, os valores do hematócrito e hemoglobina aumentavam em todos os grupos. A cada aplicação anti-helmíntica houve aumento do hematócrito e concentração de hemoglobina.

Sciavico (1996) estudou a influência da infecção natural por helmintos gastrintestinais sobre o quadro hematológico de bezerros mestiços. Usando 14 bezerros mestiços, sete tratados com anti-helmíntico, a cada quatro semanas por 18 meses, e sete sem tratamento. Acompanhados desde o nascimento até os 18 meses de idade. Foram coletadas fezes para avaliar OPG e coprocultura, e sangue para avaliar as hemácias, hemoglobina, volume globular, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração da hemoglobina corpuscular média, leucócitos, bastonetes, segmentados, eosinófilos, linfócitos e monócitos. A autora não encontrou diferença significativa no hemograma entre grupo tratado e controle, e atribuiu isso a baixa carga parasitária, principalmente de espécies hematófagas.

Estudando a relação entre desempenho e infecções por nematódeos gastrintestinais em bovinos Nelore em crescimento, durante 210 dias, Nicolau *et al* (2002) usou 28 bezerros nelores com 308 dias de idade, tratados com ivermectina e levamisole antes no início do experimento, a cada 14 dias. Os autores avaliaram o peso, OPG e volume globular (VG) dos animais. Nos resultados foi demonstrado que os valores médios de OPG variaram de 71 a 514, o VG variou de 33,1 a 37,6% e o peso de 222 a 341 kg. A correlação entre peso e VG foram negativos ou próximos de zero. Na coprocultura a predominância foi de *Cooperia* sp. Dessa maneira os autores concluíram que, nestes níveis de infecções, principalmente por *Cooperia punctata*, a parasitose não influenciou o ganho de peso e o VG.

A eosinofilia como um marcador para a resistência à *Teladorsagia circumcincta* em ovinos foi estudada por Stear *et al* (2002). Os autores testaram o valor da eosinofilia periférica como um indicador da resistência a *T. circumcincta* e exploraram as razões da aparente inconsistência da associação entre eosinofilia e OPG. Os resultados deste trabalho demonstraram que a distribuição de eosinófilos entre animais foi binomial negativa, como também foi a distribuição da contagem de OPG, e que houve uma

associação alta e negativa entre o comprimento da fêmea parasita e o número de eosinófilos nos animais. No trabalho, foi observado que a associação entre concentração de eosinófilos com a contagem de OPG foi presente somente em ovinos mais velhos, que foram submetidos a repetidas infecções. Os dados sugeriram que a associação aparece somente quando as contagens de eosinófilos estão altas. Após tratamentos anti-helmínticos as contagens de eosinófilos caíram rapidamente. Ainda, os dados suportaram que o maior mecanismo de resistência a infecção por *T. circumcisa*, em cordeiros de 3 a 7 meses, é a regulação do desenvolvimento, crescimento e fecundidade dos helmintos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento teve a duração de 15 meses, com início em maio de 2006 e o término em agosto de 2007.

3.2 OBTENÇÃO DO INÓCULO

3.2.1 Local.

O inóculo teve origem em propriedade com histórico de uso intensivo de avermectinas, onde foram realizados FECRT em 2002, localizada no município de Betim, região metalúrgica de Minas Gerais, latitude 19°51'39" sul e longitude 44°10'55" oeste¹, a 60 quilômetros da cidade de Belo Horizonte (Rangel *et al*, 2005).

A ampliação do material original foi realizada na fazenda escola do Centro Universitário Vila Velha (UVV), localizada no município de Cariacica, região central do estado do Espírito Santo, latitude 20°16'58,03" sul e longitude 40°25'41,48" oeste², a 40 quilômetros da cidade de Vitória.

¹ GPS, Magellan 315

² Google Earth 4.2 beta

No laboratório de parasitoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no Campus da Pampulha em Belo Horizonte - MG, foram realizados exames de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e coproculturas. As larvas foram identificadas no laboratório de helmintologia veterinária do Instituto de Ciências Biológicas da mesma universidade (ICB – UFMG). No laboratório de reprodução e aulas práticas da própria fazenda da UVV, foram realizados OPG e coproculturas. No laboratório de parasitologia e análises clínicas da UVV, localizado no complexo Bioagrárias, foram realizadas extrações de larvas das coproculturas, contagens de helmintos adultos e identificação dos espécimes.

3.2.2 Animais utilizados.

Para a coleta do material de origem, foram selecionados 88 bovinos da raça Canchim, de ambos os sexos, desmamados e com infestação natural por parasitos. A idade destes animais variava de nove a 12 meses e com peso médio estimado em 300 kg de peso vivo.

Seis bezerros mestiços, machos, desmamados com idade entre 7 a 9 meses, com peso médio de 127 kg de peso vivo, identificados com brinco plástico numerado, foram utilizados para ampliar o volume de larvas obtidas com o material original.

3.2.3 Instalações e manejo

Os bovinos Canchim estavam em regime de criação extensiva, em pastos de *Brachiaria brizanta*, com água e sal mineral à vontade. Tratamentos anti-helmínticos não eram realizados há pelo menos 60 dias.

Os animais utilizados para produção de larvas para o teste controlado, foram alocados em baias cobertas de estrutura metálica, com piso de concreto, sendo alimentados em cochos plásticos, com feno, concentrado de farelo de soja e farelo de

trigo, duas vezes ao dia. Água e sal mineral eram fornecidos à vontade.

3.2.4 Destino das fezes excedentes

Todo o material fecal que não foi coletado para a produção de larvas, e que ficou acumulado nas baias, foi recolhido, armazenado em área isolada e coberto com lona plástica preta de 200 micra de espessura preta por 30 dias. De acordo com recomendação de Rodrigues (2004), após este período o material foi destinado ao uso em agricultura em outros setores da fazenda, sem perigo de disseminação de verminose.

3.2.5 Seleção dos isolados e preparo do inóculo

Dos animais doares de fezes foram retirados aproximadamente 25 quilos de fezes, coletadas diretamente da ampola retal em sacos plásticos. Parte deste material original foi retirado para realização de OPG, segundo técnica de Gordon e Whitlock (1939), o restante foi manipulado misturando uma parte de fezes com duas de vermiculita, essa mistura foi preparada para coprocultura de acordo com técnica descrita por Robert e O'Sullivan (1949), modificada. O material da coprocultura, alocado em copos plásticos descartáveis de 200 mL, foi armazenado em temperatura ambiente – máxima de 27°C e mínima de 22°C – durante 12 a 14 dias. Após esse período, foi procedida a extração das larvas. A extração foi realizada enchendo os copos até a borda com água aquecida a 40°C, para a ativação das larvas. Então, o copo foi tampado com uma placa de Petri e invertido bruscamente. Foi colocada uma pequena quantidade de água na placa e o conjunto foi deixado em repouso por três horas. Em seguida, foi procedida a coleta das larvas retirando o líquido da placa. A viabilidade das larvas foi avaliada pela motilidade ao microscópio. As larvas coletadas foram quantificadas homogeneizando a amostra e retirando alíquota de 0,1 ml; depositando-a em lâmina e fixada com uma gota de solução de Lugol 1%. A lâmina foi coberta com lamínula e as larvas foram contadas, ao microscópio. O valor encontrado foi extrapolado para o

volume total da amostra estocada. A amostra foi estocada em pote plástico e conservada entre 8°C a 10°C. A identificação das larvas foi realizada de acordo com Ueno e Gonçalves (1998).

3.2.6 Ampliação do inóculo

Os seis bezerros utilizados para produção de larvas foram tratados com diaceturato de diminazeno 7%³ na dose de 3,5 miligramas por quilo (mg/kg) de peso vivo, como tratamento preventivo à babesiose, febendazole⁴ solução oral, na dose de 10 mg/kg de peso vivo, mais cloridrato de levamisole⁵ solução injetável, por via subcutânea, na dose de 7,5 mg/kg de peso vivo. Foram realizados exames OPG, três, cinco e sete dias após o tratamento. Após o último exame OPG, quando foi verificado que a contagem de ovos nas fezes foi reduzida a zero, os bezerros foram infectados com as larvas da amostra proveniente do material coletado em Belo Horizonte. A amostra foi dividida em seis seringas plásticas descartáveis de 20 mL cada, que foram utilizadas para infectar cada bezerro oralmente com aproximadamente as seguintes quantidades de larvas infectantes (L3): 2.500 de *Cooperia* sp., 1.000 de *Haemonchus* sp. e 7.000 de *Oesophagostomum* sp. Após 30 dias foram iniciadas as coletas de fezes para realização de OPG e coprocultura. Empregando os mesmos métodos descritos anteriormente, por um período de dois meses, as fezes coletadas destes bezerros foram utilizadas para produzir e armazenar larvas infectantes. As larvas produzidas e estocadas durante este período foram distribuídas uniformemente em 54 seringas plásticas descartáveis de 20 mL de volume.

3.3 INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO ARTIFICIAL SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

O inóculo utilizado foi obtido de acordo com a descrição do item 3.2 deste trabalho.

³ Beronal – Intervet do Brasil Veterinária Ltda

⁴ Panacur – Intervet do Brasil Veterinária Ltda

⁵ Ripercol – Fort Dodge Saúde Animal

3.3.1 Local.

A avaliação foi conduzida na fazenda escola da UVV. No laboratório de reprodução e aulas práticas da própria fazenda, foram realizados OPG e coproculturas. No laboratório de parasitologia e análises clínicas da UVV, localizado no complexo Bioagrárias, foram realizadas contagens fecais e exames hematológicos.

3.3.2 Animais utilizados.

Foram empregados 43 bezerros, machos, com idade entre quatro e oito meses, desmamados, mestiços holandês/zebu, com peso vivo entre 60 a 120 kg. Cada animal foi identificado com um brinco plástico numerado, fixado na orelha direita.

3.3.3 Instalações e manejo

Os animais foram alocados em baias cobertas de estrutura metálica, com piso de concreto, sendo alimentados em cochos plásticos, com feno, cana-de-açúcar – *Saccharum officinarum* – picada, concentrado de farelo de soja e farelo de trigo, duas vezes ao dia. Água e sal mineral eram fornecidos à vontade.

3.3.4 Destino das fezes excedentes

Todo o material fecal que não foi coletado dos bezerros foi submetido ao mesmo tratamento descrito no item 3.2.4.

3.3.5 Preparo dos animais e coleta

Previamente os animais foram tratados com febendazole solução oral, na dose de 10 mg/kg de peso vivo mais cloridrato de levamisole solução injetável, por via subcutânea, na dose de 7,5 mg/kg de peso vivo. Os animais foram medicados com uma associação de oxitetraciclina e diaceturato de diminazeno⁶, utilizando dose de oxitetraciclina de 20 mg/kg de peso de vivo e de 3,5mg/kg de peso vivo de diaceturato de diminazeno como preventivo a piroplasmose e infecções bacterianas.

⁶ Reverin TPB – Intervet do Brasil Veterinária Ltda.

Exames de OPG foram realizados semanalmente após o tratamento antihelmíntico inicial. Transcorridos 40 dias, quando as contagens de ovos nas fezes já haviam sido reduzidas a zero, cada bezerro foi infectado, individualmente de forma oral, com aproximadamente 11.000 L3 de *Cooperia* sp., 11.000 de *Haemonchus* sp. e 48.000 de *Oesophagostomum* sp.

Exames OPG foram realizados 0 e 46 dias pós-inoculação (p.i.). Nos dias 0 e 46 p.i. foram coletadas amostras individuais de sangue total através de punção da veia jugular, utilizando tubos a vácuo Vacuum II[®] contendo solução aquosa de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 10%). Os parâmetros avaliados ao eritograma, leucograma e determinação de proteínas plasmáticas foram determinados através de técnicas hematológicas manuais (Hendrix 2006). De todos os animais foram avaliados os parâmetros hematológicos – Volume globular (VG), proteína plasmática (PP). Do total, foram utilizadas 28 amostras para avaliar leucócitos totais (LT) e seus valores relativos – monócitos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos segmentados e neutrófilos bastonetes. No laboratório de reprodução e aulas práticas da fazenda escola do Centro Universitário Vila Velha (UVV), foram realizados OPG e coproculturas. No Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário "Prof. Ricardo Alexandre Hippler", da UVV, localizado no complexo Bioagrárias, foram realizadas extrações de larvas das coproculturas e identificação dos gêneros.

3.3.6 Análise estatística dos dados

Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal. Os parâmetros que não possuíam valores normalmente distribuídos foram log-transformados, através da fórmula: $\log_{10}(x+5)$, para serem submetidos às análises. Os parâmetros medidos nos dias 0 e 46 p.i., foram comparados através de análises de variância e de correlação linear. As correlações foram avaliadas entre os valores de OPG e os parâmetros hematológicos. Os valores médios dos parâmetros avaliados nas duas observações

foram comparados utilizando o teste t-Student, segundo Sampaio (1998) e Vieira (1988). Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa “R” versão 2.5.1 (Gentleman *et al*, 2007).

3.4 TESTE CONTROLADO

O teste foi conduzido de acordo com o preconizado por Coles *et al* (1992) e Wood *et al* (1995).

3.4.1 Local

O teste controlado foi realizado na fazenda escola da UVV. No laboratório de reprodução e aulas práticas da própria fazenda, foram realizados OPG e coproculturas. No laboratório de parasitologia e análises clínicas da UVV, localizado no complexo Bioagrárias, foram realizadas contagens e identificação de helmintos adultos.

3.4.2 Animais utilizados.

Foram empregados 54 bezerros, machos, com idade variando de quatro a oito meses, desmamados, mestiços holandês/zebu, com peso vivo entre 60 a 120 kg. Cada animal foi identificado com um brinco plástico numerado, fixado na orelha direita.

3.4.3 Instalações e manejo

Os animais foram alocados em baias cobertas de estrutura metálica, com piso de concreto, sendo alimentados em cochos plásticos, com feno, cana-de-açúcar – *Saccharum officinarum* – picada, concentrado de farelo de soja e farelo de trigo, duas vezes ao dia. Água e sal mineral eram fornecidos à vontade.

3.4.4 Destino das fezes excedentes

Todo o material fecal que não foi coletado dos bezerros foi submetido ao mesmo tratamento descrito no item 3.2.4.

3.4.5 Preparo dos animais e tratamentos

Previamente os animais foram tratados com febendazole solução oral, na dose de 10 mg/kg de peso vivo mais cloridrato de levamisole solução injetável, por via subcutânea, na dose de 7,5 mg/kg de peso vivo. Os animais foram medicados com uma associação de oxitetraciclina e diacetato de diminazeno⁷, utilizando dose de oxitetraciclina de 20 mg/kg de peso de vivo e de 3,5mg/kg de peso vivo de diacetato de diminazeno como preventivo a piropilose e infecções bacterianas.

Exames de OPG foram realizados semanalmente após o tratamento anti-helmíntico inicial. Transcorridos 40 dias, quando as contagens de ovos nas fezes já haviam sido reduzidas a zero, cada bezerro foi infectado, individualmente de forma oral, com aproximadamente 11.000 L3 de *Cooperia* sp., 11.000 de *Haemonchus* sp. e 48.000 de *Oesophagostomum* sp.

Exames de OPG foram realizados 7, 14, 28, 35 e 46 dias após a inoculação. Os dados da última contagem foram utilizados para a formação dos grupos. Foram arranjados quatro grupos de seis animais para avaliação da eficácia realizada 14 dias após tratamento, e quatro grupos de seis animais cada para avaliação da eficácia realizada 28 dias após tratamento, totalizando oito grupos de seis animais cada. A montagem dos grupos foi realizada mediante discriminação, por ordem decrescente, do resultado das contagens de OPG do quadragésimo dia após inoculação dos animais. Os oito primeiros animais com maior valor de OPG foram sorteados um para cada grupo. O processo foi repetido com os próximos oito animais da classificação, e assim sucessivamente até que 48 animais com maior OPG, dos 54 iniciais, fossem alocados. Dois grupos, designados T1, receberam tratamento placebo, e os animais dos outros grupos receberam os tratamentos com os produtos selecionados para avaliação (Tab. 5). Cada animal teve seu peso avaliado para

⁷ Reverin TPB – Intervet do Brasil Veterinária Ltda.

determinar o volume do produto a ser empregado de acordo com a dose recomendada pelo fabricante. A administração do fármaco foi efetuada no

lado esquerdo do animal, na linha média do pescoço. O dia dos tratamentos foi considerado dia 0.

Tabela 5 – Tratamentos realizados, doses utilizadas e número de animais utilizados por grupo experimental, avaliações com necropsias realizadas 14 e 28 dias após tratamento em bezerros experimentalmente infectados com helmintos gastrintestinais. Vitória – ES, 2007.

Grupo	Tratamento	Dose	Animais	Necrópsia	
				14 dias	28 dias
T1	Controle – Salina	Solução salina	12	6	6
T2	Doramectina 1%	Injetável, 200 µg/kg p.v.	12	6	6
T3	Ivermectina 3,15%	Injetável, 630 µg/kg p.v.	12	6	6
T4	Ivermectina 2,25%+Abamectina 1,25%	Injetável, 700 µg/kg p.v.	12	6	6

Foram coletadas amostras de fezes para a realização de exames de OPG e determinação da eficácia dos tratamentos através de redução do OPG. As coletas foram feitas antes do tratamento, dia 0, e nos dias 14 e 28 após o tratamento. As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais e transportadas em sacos plásticos, acondicionados em isopor com gelo, para o laboratório da própria fazenda da Universidade de Vila Velha. Os exames da contagem de ovos por grama de fezes foram realizados segundo a técnica de Gordon e Whitlock (1939) modificada.

As necropsias foram realizadas em quatro dias, a partir do 14º ou 28º dia após o tratamento, sendo sacrificados em média seis animais por dia. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas. Após o sacrifício, foi retirado o sistema digestivo que, depois de realizadas ligaduras, foram separados o abomaso, o intestino delgado e o intestino grosso.

O conteúdo e o produto da lavagem da mucosa do abomaso foram colocados em baldes graduados e completados com água até 5 litros. Após homogeneização foi realizada a retirada de uma alíquota de 10%, que foi tamisada em malha 50 (300 µm) e acondicionada em frasco contendo solução fixadora de formol a 10% aquecida até a emissão de vapor.

O conteúdo e o produto da lavagem da mucosa do intestino delgado foram colocados em baldes graduados e completados com água até 5 litros. Após homogeneização foi realizada a retirada de uma alíquota de 10%, que foi tamisada em malha 50 (300 µm) e acondicionada em frasco contendo solução fixadora de formol a 10% aquecida até a emissão de vapor.

O conteúdo e o produto da lavagem da mucosa do intestino grosso foram colocados em baldes graduados e completados com água até 5 litros. Após homogeneização foi realizada a retirada de uma alíquota de 10%, que foi tamisada em malha 50 (300 µm) e acondicionada em frasco contendo solução fixadora de formol a 10% aquecida até a emissão de vapor.

Em seguida, todos os segmentos foram submetidos à imersão em solução de ácido clorídrico (HCl) 2%, aquecida até a emissão de vapor, por duas horas. O órgão foi retirado do recipiente e a solução com HCl foi tamisada em malha 50 (300 µm). O sólido recuperado foi acondicionado em frasco contendo solução fixadora de formol a 10%, aquecida até a emissão de vapor.

No laboratório, as alíquotas de 10% do conteúdo total foram examinadas em uma placa de petri riscada, com auxílio de microscópio estereoscópico, sendo

realizadas as contagens de helmintos encontrados.

As formas adultas dos nematódeos recuperados foram montadas entre lâmina e lamínulas, empregado-se lactofenol como clarificador, sendo então identificadas em microscópio ótico, utilizando como base de descrição das espécies efetuadas por Fonseca e Pereira (2002).

A eficácia dos tratamentos foi avaliada a partir das médias aritméticas e das médias geométricas do número de helmintos encontrados nos diferentes órgãos de cada bovino, utilizando os valores encontrados nas alíquotas, de acordo com Wood *et al.* (1995).

3.4.6 Cálculo da eficácia e análise dos dados.

A fim de tornar as variâncias independentes da média e a distribuição da frequência das contagens próxima à normal, os dados foram transformados em logaritmo:

$$x = \log (\text{cont}+5).$$

onde,

cont = contagens individuais das cargas parasitárias.

A eficácia dos tratamentos avaliados pela contagem de OPG foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de eficácia} = \left[1 - \left(\frac{C_i}{C_f} \times \frac{T_f}{T_i} \right) \right] \times 100$$

onde,

C_f = média das contagens finais dos animais do grupo controle.

C_i = média das contagens iniciais dos animais do grupo controle.

T_f = média das contagens finais dos animais do grupo tratado.

T_i = média das contagens iniciais dos animais do grupo tratado.

A eficácia dos tratamentos avaliados pelas necropsias foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de eficácia} = \left(\frac{C_f - T_f}{C_f} \right) \times 100$$

onde,

C_f = média das contagens finais dos animais do grupo controle.

T_f = média das contagens finais dos animais do grupo tratado.

Os dados foram analisados por técnicas estatísticas de análise da associação de variáveis quantitativas e medidas de tendência central. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 0,05. Foi utilizado o Teste T para análise entre as avaliações realizadas 14 e 28 dias p.t.. As análises das eficácias foram realizadas com Teste F e teste de Duncan (Sampaio, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTE DE REDUÇÃO DE OPG

Os resultados das contagens de OPG realizados 14 dias após os tratamentos demonstram que a associação de avermectinas foi o tratamento que apresentou a maior eficácia, redução de 96%. As eficácias da doramectina 1% e ivermectina 3,15% foram de 72% e 52%, respectivamente (Tab. 7).

De acordo com Coles *et al* (1992), a redução da carga parasitária menor do que

90% no FECRT está associada à resistência aos anti-helmínticos. Nesta análise, o produto com associação de ivermectina 2,25% e abamectina 1,25% é o único eficaz contra esses isolados de helmintos, que se mostraram resistentes para ivermectina 3,15% e doramectina 1%. Resultados semelhantes, de eficácia do produto formulado com ivermectina 2,25% mais abamectina 1,25% contra isolados resistentes às avermectinas, foram encontrados por Nascimento *et al* (2003) e Costa *et al* (2004) para *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp. Porém, nestes trabalhos não foram observados *Oesophagostomum radiatum* resistentes.

Tabela 6 – Média e porcentagem de redução da contagem de ovos nas fezes de bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, tratados com avermectinas e avaliados no dia 0 e 14 dias pós-tratamento. Vitória - ES, 2007.

Tratamentos/DPT*	Ovos por grama de fezes	
	Dia 0	Dia 14
Controle	183 (0-600)	400 ^a (0-1200)
Doramectina 1%	833 (100-3700)	517 ^a (0-1500)
Redução %		72
Ivermectina 3,15%	333 (0-1200)	350 ^a (0-1200)
Redução %		52
Ivermectina 2,25% + abamectina 1,25%	550 (100-2200)	50 ^b (0-100)
Redução %		96

Entre tratamentos, médias com letras diferentes são significativamente diferentes (P<0,05).

Valores entre parêntesis representam a amplitude da contagem fecal de ovos.

* Dias pós-tratamento.

Apesar dos protocolos disponíveis para testar resistência aos anti-helmínticos mencionarem a importância da observação da farmacocinética dos produtos empregados, os intervalos entre tratamentos e avaliações vigentes contemplam fármacos de ação curta ou prolongada (Coles *et al*, 1992 e Wood *et al*, 1995), mas não os de ação ultraprolongada. Baseado nas farmacocinéticas dos produtos com concentração de lactonas macrocíclicas acima de 3% (Santos *et al*, 2003), foram realizadas avaliações 28 dias após os tratamentos.

As eficácias avaliadas neste momento não demonstraram alterações quando

comparadas com as observações realizadas anteriormente. Doramectina 1% e ivermectina 3,15% continuaram ineficazes, enquanto que a associação de avermectinas apresentou eficácia de 97% (Tab. 8). Isso está de acordo com a farmacocinética dos produtos. Os Tmax dos produtos testados ocorrem em 5,3 e 9,14 dias para doramectina 1% e ivermectina 3,15%, respectivamente (Toutain *et al*, 1997 e Lifschitz *et al*, 2007). Para a associação de avermectinas o Tmax ocorre entre 14 e 16 dias (Santos *et al*, 2003). Dessa maneira, a concentração plasmática dos fármacos apresenta nível suficiente para ser eficaz e manter a eficácia até a segunda observação 28 dias após o tratamento.

Tabela 7 – Média e porcentagem de redução da contagem de ovos nas fezes de bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, tratados com avermectinas e avaliados no dia 0 e 28 dias pós-tratamento. Vitória - ES, 2007.

Tratamentos/DPT*	Ovos por grama de fezes	
	Dia 0	Dia 28
Controle	183 (0-400)	767 ^a (200-2600)
Doramectina 1% Redução %	533 (0-2300)	217 ^a (0-500) 78
Ivermectina 3,15% Redução %	350 (0-1100)	367 ^a (0-700) 75
Ivermectina 2,25% + abamectina 1,25% Redução %	500 (0-2100)	67 ^b (0-200) 97

Entre tratamentos, médias com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Valores entre parêntesis representam a amplitude da contagem fecal de ovos

* Dias pós-tratamento.

4.2 INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO ARTIFICIAL SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.

No teste Shapiro-Wilk os valores de OPG, de leucócitos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e segmentados, no dia 0 p.i., não apresentaram distribuição normal. Na análise do dia 46 p.i., os valores de OPG e da série branca também não apresentaram valores com distribuição normal, exceto os valores de leucócitos e linfócitos ($P < 0,05$). Esse tipo de distribuição não normal, para os parâmetros avaliados, também foi encontrada por Whitlock (1961), Nicolau *et al* (2002) e Stear *et al* (2002).

No momento da infecção artificial, dia 0, o valor de OPG foi nulo, confirmando que os animais estavam livres de infecções por helmintos gastrintestinais. Na mesma observação, os valores médios de leucócitos totais, monócitos, eosinófilos, neutrófilos segmentados e neutrófilos bastonetes estavam normais, segundo os valores preconizados por Kramer (2006). Este autor foi utilizado como referência para comparar os valores encontrados na hematologia realizada neste trabalho. O valor da contagem média de linfócitos apresentaram um ligeiro aumento, quando comparados com o valor normal (Tab. 9).

Do grupo de 28 bezerros avaliados, haviam de três a 13 animais com contagens acima dos valores normais nas categorias da série branca, dependendo do tipo de células analisadas. Exceto em eosinófilos, onde todos os animais apresentavam valores normais (Anexo IV e V). Em ruminantes os linfócitos são predominantes em relação aos outros leucócitos. No entanto, os valores decrescem conforme a idade. Em animais submetidos ao efeito de estresse podemos observar uma linfocitose fisiológica, podendo variar em intensidade de acordo com a resposta do animal (Kramer, 2006). Na segunda observação, realizada no dia 46 p.i., o valor médio de OPG foi de 557. Considerando os gêneros inoculados e os padrões descritos por Ueno e Gonçalves (1998), este grau de infecção é considerado de leve a moderado. Nesta observação, os valores da série branca mantiveram o mesmo padrão da contagem anterior com relação aos parâmetros normais. Entre as duas observações todos os valores do leucograma diminuíram. Utilizando o teste de comparação de médias t-Student, foi verificada que somente a diferença entre as observações de eosinófilos e neutrófilos segmentados foi estatisticamente significativa. As demais categorias da série branca não apresentaram diferenças significativas entre as observações (Tab. 9).

Na observação realizada no dia 46 p.i., não houve correlação significativa entre o valor de OPG e os todos os valores do leucograma ($P < 0,05$). Apesar da resposta imunológica do hospedeiro aos helmintos envolver uma forte atividade celular, principalmente com participação de eosinófilos (Tizard, 1998), essa resposta é diretamente relacionada com a idade dos animais e exposições prévias aos helmintos, além de ser variável entre os animais (Kanobana, 2003). Como observaram Stear *et al* (2002) em ovinos, o aumento dos eosinófilos no hospedeiro com conseqüente diminuição do OPG através da regulação do tamanho e da fertilidade das fêmeas de *Teladorsagia circumcincta*, foi verificado nos animais mais velhos que haviam experimentado várias exposições aos

helmintos, mas não em animais novos. Pelo fato dos bezerros utilizados serem jovens e oriundos de manejos que limitam a infecção por helmintos, não foi observada resposta imunológica significativa contra os helmintos inoculados e nem interferência nos valores de OPG.

Além disso, as diminuições dos neutrófilos segmentados e eosinófilos podem ser observadas em ruminantes devido a sua capacidade de armazenamento e liberação dessas células pela medula óssea. Ruminantes possuem quantidade celular menor no grupo de armazenamento da medula óssea, fazendo com que a resposta leucocitária a partir dos granulócitos demore a acontecer (Jain, 1993).

Tabela 8 – Média aritmética, desvio padrão, amplitude (entre parêntesis) e padrões de referência das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), leucócitos totais, monócitos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos segmentados e neutrófilos bastonetes; de observações realizadas antes e após infecção com helmintos resistentes, em bovinos mestiços. Vitória – ES, 2007.

Categoria/DPI*	Dia 0	Dia 46	Parâmetros normais**
OPG	0 ± 0^a (0-0)	557 ± 909^b (0-3700)	
Leucócitos totais (/μL)	11.898 ± 3.575^a (7600-27500)	10.846 ± 2.518^a (6750-15600)	4.000-12.000 (8.000)
Monócitos (/μL)	$697,93 \pm 420,83^a$ (115-1586)	$501,79 \pm 358,05^a$ (0-1325)	25-840 (400)
Linfócitos (/μL)	$7694,23 \pm 3114,91^a$ (4732-22000)	$7534,89 \pm 1985,87^a$ (4442-12792)	2.500-7.500 (4.500)
Eosinófilos (/μL)	$380,55 \pm 377,76^a$ (0-1904)	$247,46 \pm 274,43^b$ (0-875)	0-2.400 (700)
Neutrófilos Segmentados (/μL)	$3125,5 \pm 1182,57^a$ (1368-7199)	$2562,93 \pm 1393,58^b$ (984-5963)	600-4.000 (2.000)
Neutrófilos Bastonetes (/μL)	0 ± 0^a (0-0)	0 ± 0^a (0-0)	0-120 (20)

Entre observações, médias com letras distintas são significativamente diferentes. ($P < 0,05$).

*DPI – dias pós-inoculação

** Kramer, 2006. Valores entre parêntesis correspondem à média.

Na mensuração de OPG, VG e PP dos 43 bezerros avaliados, empregando o teste Shapiro-Wilk, foi observado que somente os valores de OPG não apresentaram distribuição normal. No momento da infecção artificial, dia 0, o valor de OPG foi nulo, confirmando que os animais estavam livres de infecções por helmintos gastrintestinais. Nesta observação o valor médio de VG encontrado, de 28,1 %, e o valor de cada um dos bezerros avaliados estavam dentro do padrão de referência (Tab. 10) (Kramer, 2006).

O valor médio de PP no início das avaliações; de 6,3 g/dL; encontrava-se abaixo do valor desejável (Tab. 10) e apenas oito bezerros apresentaram valores no intervalo aceito como normal. Ainda que a alimentação dos animais tenha sido calculada para suprir a sua demanda energética e protéica, os bezerros iniciaram o experimento em péssimas condições nutricionais, decorrentes do manejo inadequado das propriedades de origem. Como descrito por Ferreira-Neto *et al* (1978), a hipoproteinemia é um achado

freqüente em animais nas condições nutricionais descritas.

O valor de OPG observado 46 dias p.i. foi de 436, valor considerado como grau de infecção leve a moderada, segundo Ueno e Gonçalves (1998), levando em consideração os gêneros de helmintos trabalhados. Apesar da contagem média de OPG encontrada não ser alta, ao final do experimento alguns animais apresentavam sintomas clínicos de verminose, como edema submandibular, apatia e anemia, em vários animais. Isso é condizente com a hipoproteinemia que foi observada. Comparando as observações dos dias 0 e 46, houve diminuição dos valores de VG e PP. Nas duas variáveis foram verificadas diferenças estatisticamente significativas. Nesta segunda avaliação o valor médio de VG foi de 23,81 %, pouco abaixo do limite mínimo de referência. Dos valores individuais, 18 bezerros apresentaram valores de VG menores que o valor de referência. O valor médio de PP nesta observação; 5,0 g/dL; e todos valores individuais encontrados estavam abaixo do padrão normal.

Tabela 9 – Média aritmética, desvio padrão e amplitude (entre parêntesis) das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), volume globular e proteínas plasmáticas; de observações realizadas antes e após infecção com helmintos resistentes, em bovinos mestiços. Vitória – ES, 2007.

DPI/Categoria	OPG	Volume globular (%)	Proteína plasmática (g/dL)
Dia 0	0 ± 0 ^a (0-0)	28,1 ± 4,02 ^a (20,0-40,0)	6,3 ± 0,70 ^a (5,0-7,8)
Dia 46	436 ± 766 ^b (0-3700)	23,81 ± 5,50 ^b (14,0-36,0)	5,0 ± 1,08 ^b (2,5-6,8)
Parâmetros normais **		24-46 (35)	7,5-8,5

Valores entre parêntesis representam a variação da contagem

Entre observações, médias com letras distintas são significativamente diferentes. (P < 0,05).

*DPI – dias pós-inoculação

** Kramer, 2006.

A influência direta dos helmintos sobre VG e PP em bezerros depende principalmente da carga parasitária, potencial patogênico do gênero parasita trabalhado e resistência do hospedeiro. Animais parasitados por espécies hematófagas e que causam perda tecidual, como as dos gêneros *Haemonchus* sp. e *Oesophagostomum* sp., sofrem perdas sanguíneas e protéicas maiores do que os parasitados somente pelo gênero *Cooperia* sp. (Freitas, 1980; Urquhart *et al*, 1998; Ueno e Gonçalves, 1998). Os sintomas clínicos e a diminuição dos níveis de proteínas plasmáticas e do volume globular observados correspondem à parasitose induzida nos animais. Principalmente a esofagostomose, devido a alta carga infectante utilizada neste experimento. Como observado por Delaune (1939), Ross e Armour (1960) e Bremner (1966), animais parasitados por *Oesophagostomum radiatum* e/ou *Haemonchus* sp. têm diminuição da concentração de proteína no soro sanguíneo, do número de hemácias e do volume globular. Bremner (1970) observou que a perda de sangue por hemorragia intestinal, em animais parasitados por *Oesophagostomum radiatum*, ocorre, principalmente, de três a sete semanas após a infecção. Isso está de acordo com o período entre a infecção e a avaliação, de 46 dias, utilizado neste experimento.

Na segunda observação houve correlação significativa negativa entre OPG e os parâmetros hematológicos VG, -0,373 ($P < 0,05$), e PP, -0,496 ($P < 0,01$). Esse tipo de correlação não foi observada por Sciavico (1996) e Nicolau *et al* (2002) devido à baixa carga parasitária ou ausência de espécies parasitas hematófagas. Contudo, dados semelhantes, com a influência da helmintose sobre os parâmetros de VG ou PP, foram encontrados por autores que também trabalharam com espécies hematófagas em bezerros mestiços (Harness *et al*, 1970; Seifert, 1971; Viana e Campos, 1974; Lima, 1980).

4.3 TESTE CONTROLADO

Duas a três semanas após a infecção artificial houve sintomatologia clínica como citado no item 4.2.

As recomendações da segunda edição do guia da World Association for Advancement of Veterinary Parasitology, elaborado por Wood *et al* (1995), delimitam quatro classificações de eficácia dos anti-helmínticos para cada gênero/espécie: Altamente efetivo – acima de 98%, efetivo – entre 90% e 98%, moderadamente efetivo – entre 80% e 89%, e insuficientemente ativo – menor de 80%.

Nas necropsias, foram encontrados no abomaso estágios adultos de *Haemonchus placei*, no intestino delgado adultos de *Cooperia punctata* e *Oesophagostomum radiatum*. No intestino grosso estágios adultos de *Oesophagostomum radiatum*.

As avaliações realizadas 14 dias após tratamento com a média aritmética demonstraram que os produtos foram insuficientemente ativos contra *H. placei*. Somente o medicamento com a associação de avermectinas foi efetivo contra *Cooperia punctata*, com eficácia de 97%. O produto formulado com doramectina 1% e o formulado com ivermectina 3,15%, foram insuficientemente ativos contra este helminto, apresentando eficácia de 66% e 18%, respectivamente. As eficácias da doramectina 1% e ivermectina 3,15% contra *O. radiatum* também foram insuficientes, 39% e 52 %, respectivamente. O produto com ivermectina 2,25% e abamectina 1,25% combinados apresentou eficácia de 95%, foi o único tratamento efetivo (Tab. 11 e 12).

Esses achados estão de acordo com Nascimento *et al* (2003) que também encontraram *Cooperia* sp. e *Haemonchus placei* resistentes à ivermectina 3,15%, onde somente *Cooperia* sp. foi sensível à formulação com ivermectina 2,25% e abamectina 1,25%.

Nas comparações estatísticas das médias aritméticas dos helmintos avaliados 14 p.t., não foi observada diferença entre as cargas parasitárias de *H. placei* entre todos os tratamentos. A média de helmintos adultos de *C. punctata* não diferiu entre o grupo controle e os grupos tratados com

ivermectina 3,15% e doramectina 1%, mas essas médias foram diferentes da média do grupo tratado com a associação de avermectinas. O mesmo aconteceu com as contagens médias de *O. radiatum*, somente o grupo da associação de avermectinas diferiu dos demais grupos (Tab. 10).

Tabela 10 – Média aritmética e porcentagem de redução das contagens de nematóides de bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, tratados com avermectinas e avaliados 14 dias pós-tratamento. Vitória - ES, 2007.

Espécie	Controle	Doramectina 1%	Ivermectina 3,15%	Ivermectina 2,25%+ abamectina 1,25%			
	média de helmintos	média de helmintos	Redução %	média de helmintos	Redução %	média de helmintos	Redução %
<i>H. placei</i>	300 ^a	60 ^a	80	180 ^a	40	77 ^a	74
<i>C. punctata</i>	970 ^a	330 ^a	66	795 ^a	18	33 ^b	97
<i>O. radiatum</i>	2272 ^a	1380 ^a	39	1093 ^a	52	122 ^b	95
Total	7083 ^a	3540 ^a	50	4137 ^a	42	463 ^b	93

Entre observações, médias com letras distintas são significativamente diferentes. (P < 0,05).

A análise realizada 28 dias após o tratamento revelou que a eficácia contra *H. placei* da doramectina 1% e da ivermectina 3,15% foi de 18% e 0%, respectivamente. Sendo, ambos insuficientemente ativos. Já o produto composto de ivermectina 2,25% e abamectina 1,25% apresentou eficácia de 89%, sendo moderadamente efetivo. A eficácia da doramectina 1% contra *Cooperia punctata* foi moderadamente efetiva, com a taxa de redução de 85%. A eficácia da

ivermectina 3,15% foi de 52%. A associação de avermectinas foi altamente efetiva apresentando a maior taxa de todas as análises, 98% de redução da carga parasitária. Nessa avaliação, a doramectina 1% e ivermectina 3,15% não foram eficazes contra *O. radiatum*, O medicamento composto com avermectinas foi moderadamente efetivo, com 86% de redução da carga desta espécie (Tab. 11).

Tabela 11 – Média e porcentagem de redução das contagens de nematóides de bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, tratados com avermectinas e avaliados 28 dias pós-tratamento. Vitória – ES, 2007.

Espécie	Controle	Doramectina 1%	Ivermectina 3,15%	Ivermectina 2,25%+ abamectina 1,25%			
	Média de helmintos	média de helmintos	Redução %	média de helmintos	Redução %	média de helmintos	Redução %
<i>H. placei</i>	165 ^a	135 ^a	18	173 ^a	0	18 ^b	89
<i>C. punctata</i>	1342 ^a	195 ^b	85	647 ^{ab}	52	33 ^c	98
<i>O. radiatum</i>	872 ^a	1277 ^a	0	1413 ^a	0	118 ^b	86
Total	4757 ^a	3213 ^a	32	4467 ^a	6	340 ^b	93

Entre observações, médias com letras distintas são significativamente diferentes (P < 0,05).

As médias aritméticas dos helmintos adultos observadas para *H. placei* e *O. radiatum* foram semelhantes estatisticamente entre os grupos controle, ivermectina 3,15% e doramectina 1%. Para estas espécies, o grupo tratado com ivermectina 2,25% mais abamectina 1,25% apresentou média de helmintos adultos estatisticamente menor do que os demais grupos. A contagem média

de *C. punctata* do grupo controle foi semelhante estatisticamente ao grupo ivermectina 3,15%, mas diferente do grupo doramectina 1%. O grupo tratado com a associação de avermectina apresentou média de contagem de helmintos estatisticamente menor do que os demais grupos (Tab. 12).

Tabela 12 – Porcentagem de redução de OPG, utilizando media aritmética, de tratamentos endectocidas em bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, avaliada 14 e 28 dias pós-tratamento. Vitória – ES, 2007.

Espécie	Doramectina 1%		Ivermectina 3,15%		Ivermectina 2,25% + abamectina 1,25%	
	14	28	14	28	14	28
<i>H. placei</i>	80	18	40	0	74	89
<i>C. punctata</i>	66	25	18	52	97	98
<i>O. radiatum</i>	39	0	52	0	95	86
Total	50	32	42	6	93	93

A análise das médias aritméticas da carga total de helmintos, considerando as três espécies trabalhadas, revela que o produto com ivermectina 2,25% mais abamectina 1,25% apresentou eficácia de 93% em ambas as observações, 14 e 28 dias. Superior aos outros dois produtos analisados. A eficácia da doramectina 1% contra a carga total foi de 50% e 32%, aos 14 e 28 dias, respectivamente. A ivermectina 3,15% apresentou os piores resultados, eficácia de 42% no dia 14 e

apenas 6% aos 28 dias após tratamento (Tab. 12).

A média geométrica também pode ser utilizada para a verificação da eficácia anti-helmíntica (Wood *et al*, 1995). Os valores da eficácias analisados pela média geométrica das contagens foi ligeiramente diferente das contagens com média aritmética. Contudo, os níveis de eficácia de ambas médias foi aproximado (Tab. 12 e 13).

Tabela 13 – Porcentagem de redução de OPG, utilizando media geométrica, de tratamentos endectocidas em bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, avaliada 14 e 28 dias pós-tratamento. Vitória – ES, 2007.

Espécie	Doramectina 1%		Ivermectina 3,15%		Ivermectina 2,25% + abamectina 1,25%	
	14	28	14	28	14	28
<i>H. placei</i>	73	38	24	44	67	90
<i>C. punctata</i>	74	79	37	65	96	97
<i>O. radiatum</i>	0	16	0	0	86	94

Na análise das médias aritméticas das contagens de helmintos entre as observações realizadas 14 e 28 dias p.t., pode-se observar que não houve diferença entre observações nos grupos. As médias

que apresentaram a maior diferença foram de *H. placei* para a associação de avermectinas. Contudo, não foi suficiente para se obter uma diferença estatística ($P < 0,10$) (Tab. 14).

Tabela 14 – Médias aritméticas das contagens de nematóides de bovinos infectados com larvas de helmintos suspeitas de resistência, tratados com avermectinas e avaliados 14 e 28 dias pós-tratamento. Vitória – ES, 2007.

Espécie	Controle		Doramectina 1%		Ivermectina 3,15%		Ivermectina 2,25% + abamectina 1,25%	
	14	28	14	28	14	28	14	28
<i>H. placei</i>	300 ^a	165 ^a	60 ^a	135 ^a	180 ^a	173 ^a	77 ^a	18 ^a
<i>C. punctata</i>	970 ^a	1342 ^a	330 ^a	195 ^a	795 ^a	647 ^a	33 ^a	33 ^a
<i>O. radiatum</i>	2272 ^a	872 ^a	1380 ^a	1277 ^a	1093 ^a	1413 ^a	122 ^a	118 ^a
Total	3542 ^a	2379 ^a	1770 ^a	1607 ^a	2068 ^a	2233 ^a	232 ^a	169 ^a

Entre observações dos tratamentos, médias com letras distintas são significativamente diferentes ($P < 0,10$)

Utilizando os parâmetros recomendados por Coles *et al* (1992) e Wood *et al* (1995) é possível observar que os helmintos da espécie *Haemonchus placei* são resistentes aos fármacos ivermectina 3,15%, doramectina 1% e ivermectina 2,25% mais abamectina 1,25%.

A presença da abamectina na formulação do produto composto parece ser a razão da eficácia do fármaco contra os isolados de helmintos. Apesar da semelhança na estrutura química com a ivermectina, outros trabalhos já demonstraram a eficácia superior da abamectina contra helmintos resistentes às outras avermectinas (Leathwick *et al*, 2000; Nascimento *et al*, 2003; Alka *et al*, 2004; Rangel *et al*, 2005).

Essa diferença de eficácia entre a abamectina e outras avermectinas ainda não está explicada na literatura. Contudo, sabe-se que no mecanismo de resistência às lactonas macrocíclicas pode haver a atuação da glicoproteína-P presente nos parasitos aumentando o metabolismo e/ou excreção da droga. Diminuindo, assim, seu efeito no parasito (Didier e Loor, 1996; Xu *et al*, 1998; Borges *et al*, 2005; Lifschitz *et al*,

2007; Lespine *et al*, 2007; Roulet e Prichard, 2007).

Sabe-se também que a abamectina é mais tóxica do que a ivermectina. Essa toxicidade envolve a habilidade da abamectina ser encontrada no SNC e provocar manifestações nervosas (Seaman *et al*, 1987; Lankas e Gordon, 1989). A capacidade da abamectina de atravessar a barreira hemato-encefálica envolve uma menor afinidade dessa com a glicoproteína-P, presente nas células endoteliais dos capilares da barreira (Shoop e Soll, 2002). Então, pode-se inferir que a menor afinidade da abamectina com a glicoproteína-P também ocorra nos helmintos resistentes às avermectinas, tornando-a mais eficaz contra estes helmintos.

Relatos de isolados de helmintos resistentes às lactonas macrocíclicas em bovinos têm se tornado freqüentes na literatura, principalmente utilizando FECRT (Bisset *et al*, 1990; Watson *et al*, 1995; Vermunt *et al*, 1996; Anziani *et al*, 2000; Coronado *et al*, 2003; Anziani *et al*, 2004; Suarez e Cristel, 2005; Rangel *et al*, 2005; Paes-Oliveira *et al*, 2006; Soutello *et al*, 2007). Contudo, poucos são os relatos que utilizam testes

controlados. Segundo Eddi *et al* (2002), os relatos na América do Sul somente utilizaram a redução de contagem fecal para avaliar a eficácia.

Esses relatos se devem à pressão de seleção na América do Sul que é alta devido aos numerosos tratamentos anti-helmínticos por ano, ausência de refúgio e intensa migração de novos animais com possibilidade de helmintos resistentes (Lifschitz, 2007). Corroborando com este argumento, Echevarria (2002) afirma que a grande variedade de marcas comerciais, associadas às campanhas eficientes de marketing e à diminuição relativa dos preços dos produtos, tem levado a um uso intenso e indiscriminado de anti-helmínticos nos rebanhos. Dessa maneira, a mudança no cenário dos produtos anti-helmínticos utilizados no Brasil favorece o aparecimento de isolados resistentes. Em 1981, no início do lançamento da ivermectina 1%, havia somente uma empresa fabricante com uma marca disponível para comercialização. A única dosagem recomendada para bovinos era 200 µg/kg. Hoje, após a introdução de novos compostos endectocidas, como consequência da queda da patente da ivermectina, há vários produtos formulados com lactonas macrocíclicas, existindo 147 fármacos e apresentações diferentes de endectocidas no mercado, fabricados por 42 empresas (Sindan, 2007b). Esses produtos podem carecer de um controle de qualidade como observado por Monteiro *et al* (1998) no Kenya. Como observou Eddi *et al* (2002), o controle de qualidade dos produtos anti-helmínticos também é um problema em Países da América do Sul. Efetivamente, no Brasil, não há uma regulamentação para o controle de biodisponibilidade dos fármacos veterinários, como ocorre em medicamentos para humanos. Com intuito de corrigir isso, atualmente há um projeto de lei complementar – SF PLC 0003/2005 – no Senado Federal que propõe o medicamento genérico de uso veterinário, e o aumento de controle de qualidade destes medicamentos (Senado Federal, 2007).

Soma-se a isso, a atual situação da comercialização de endectocidas com concentrações e dosagens superiores às

formulações inicialmente comercializadas. Entre os países onde se comercializa as lactonas macrocíclicas, somente no Brasil tem-se a oferta de tantas apresentações de formulações com altas concentrações e dosagens. Pode-se encontrar no nosso mercado ivermectina 3,15% (630 µg/kg) (Merial, 2007), ivermectina 3,5% (700 µg/kg) (Novartis, 2007), associação de ivermectina 2,25% mais abamectina 1,25% (total de 700 µg/kg) (Intervet, 2007), ivermectina 4% (800 µg/kg) (Ouro Fino, 2007) e moxidectina 10% (1.000 µg/kg) (Fort Dodge, 2007). Isso agrava a situação da resistência anti-helmíntica no país, já que, como observado por Lifschitz (2007), os fármacos com concentrações mais altas podem selecionar com mais eficácia para resistência.

Toda essa pressão exercida pela indústria farmacêutica para uso das lactonas macrocíclicas é refletida pelo aumento das vendas dos endectocidas, que foi 48,88% entre 2002-2006. Um percentual muito acima da média do mercado no mesmo período; 34,35% (Sindan, 2007a). Essa pressão de oferta de antiparasitários e todo o conjunto de fatores citados, convergem como uma força motriz para a pressão de seleção exercida nos helmintos no nível de fazenda, e torna o Brasil um país impar no desenvolvimento da resistência anti-helmíntica.

5. CONCLUSÕES

1) A inoculação de bezerros com L3 de *Haemonchus Placei* (11.000), *Cooperia pectinata* (11.000) e *Oesophagostomum radiatum* (48.000) permitem a execução de teste controlado para verificação de resistência anti-helmíntica.

2) Isolados de *Haemonchus placei* foram identificados como resistentes à ivermectina 3,15%, doramectina 1% e à associação de ivermectina 2,25% mais abamectina 1,25%.

3) Isolados de *Oesophagostomum radiatum* e *Cooperia punctata* foram identificados como resistentes à doramectina 1% e ivermectina 3,15%. Esses mesmos isolados

são sensíveis à associação de ivermectina 2,25% mais abamectina 1,25%.

4) No teste controlado para avaliação da eficiência de avermectinas contra isolados de helmintos resistentes, utilizando fármacos formulados com doramectina 1%, ivermectina 3,15% e uma associação de ivermectina 2,25% mais abamectina 1,25%, não há diferença na avaliação comparada no 14° e 28° dia após tratamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EL-ABDELLATI, A.; VERCRUYSSSE, J.; WOLSTENHOLME, A.J. *et al.* Analysis of the L256F mutation in a new ivermectin resistant *Cooperia oncophora* isolate. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 21st, 2007, Gent, Anais...Gent: WAAVP, 2007. p.388.

ALKA, R.M.; GOPAL, K.S.; SANDHU, P.K. Efficacy of abamectin against ivermectin-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Vet. Parasitol.* v. 121, p. 277-283, 2004

ANZIANI, O.S. Resistencia de los nematodos gastrointestinales de los bovinos a los antihelmínticos. Disponível em: http://www.inta.gov.ar/producto/helminto/rtan/dil_15.htm. Acesso em: 09/09/2002.

ANZIANI, O.S.; SUAREZ, V.; GUGLIELMONE, A.A.; *et al.* Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. *Vet. Parasitol.* v.122, p. 303-306, 2004.

ANZIANI, O.S.; ZIMMERMANN, G.; GUGLIELMONE, A.A. *et al.* Resistance to avermectinas of parasitized bovines by *Cooperia* sp. *Vet. Arg.*, v.17, n.164, p.280-281, 2000.

BALLWEBER, L.R.; SIEFKER, C.; ENGELKEN, T. *et al.* Persistent activity of doramectin injectable formulation against experimental challenge with *Haemonchus placei* in cattle. *vet parasitol.* v. 86, p. 1-4, 1999.

BIANCHIN, I. Epidemiologia e controle de helmintos gastrintestinais em bezerros a partir da desmama, em pastagem melhorada, em clima tropical do Brasil. 1991. 162 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BIANCHIN, I.; MELO, H. J. H. Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados e o controle estratégico no Brasil. *Campo Grande: EMBRAPA CNPGC*, 1993, p. 5-30 (Circular técnica. n.24).

BISSET, S.A.; BRUNSDON, R.V.; FORBES, S. Efficacy of a topical formulation of ivermectin against naturally acquired gastrointestinal nematodes in weaner cattle. *N.Z. Vet. J.* v. 38, p. 4-6, 1990.

BORGES, F. A.; RODRIGUES, D. C.; LOPES, W.D.Z.; *et al.* Resistência de *Haemonchus placei*, *Cooperia punctata* e *C. spatulata* à ivermectina em bovinos no estado de Minas Gerais, Brasil. In CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13, 2004, Ouro Preto. Anais...Ouro Preto:2004.

BORGES, F.A.; SILVA, H.C.; BUZZOLINI, C.; SOARES, V.E.; COSTA, A.J.; MOLENTO, M.B. Use of verapamil to increase anthelmintic efficacy of ivermectin against drug selected strain of *Haemonchus contortus*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 20th, 2005, Christchurch, Anais... Christchurch: WAAVP, 2005. p.10.

- BREMNER, K.C. Relative influence of three gastro-intestinal nematodes of cattle on the concentrations of hemoglobin and serum protein in the host. *Nature*, v. 212, p.29-430, 1966.
- BREMNER, K.C. Pathogenic factors in experimental bovine Oesophagostomosis. *Exp. Parasitol.* v.27, n.2, p. 236-245, 1970.
- BURG, R.W.; MILLER, B.M.; BACKER, E.E. *et al.* Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.15, n. 3, p. 361-367, 1979.
- BURG, R.W.; STAPLEY, E.O. Isolation and Characterization of the Producing Organism. In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) Ivermectin and Abamectin. Nova York: Springer-Verlag, 1989. p. 25-28.
- CARDOSO, J.M.S; SANT'ANA, F.B.; MARTINS, I.V.F. *et al.* Identificação de *Cooperia punctata* (Linstow, 1907) resistente a ivermectin e doramectin em bovinos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. *Anais...*Rio de Janeiro: 2002.
- CARNEIRO, J.R.; FREITAS, M.G. Curso natural de infecções helmínticas em bezerros nascidos durante a estação chuvosa em Goiás. *Arq. Esc. Vet. UFMG.* v.1, n. 29, p.43-48, 1977.
- CONDER, G.A. e BAKER, W.J. Chemistry, pharmacology and safety of the macrocyclic lactones: Chemistry, Pharmacology and Safety: Doramectin and Selamectin. In: VERCRUYSSSE, J.; REW, R.S. (Ed.) *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy.* Wallingford: CABI Publishing, 2002. p.30-31.
- COLES, G.C. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? *Vet. Res.* v.33, p.481-489, 2002.
- COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.*, v.44, p.35-44, 1992.
- COLES, G.; STAFFORD, K., MACKAY, P. Ivermectin-resistant *Cooperia* species from calves on a farm in Somerset. *Vet. Rec.*, p. 255-256, 1998.
- COSTA, A. J.; OLIVEIRA, G.; ARANTES, T.P. *et al.* Avaliação comparativa da ação anti-helmíntica e do efeito no desenvolvimento ponderal de bezerros tratados com diferentes avermectinas de longa ação. *A Hora Veterinária*, n. 139, p. 1-4, 2004.
- CORONADO, A.; ESCALONA, J.; HENRIQUEZ, H.; MUJICA, F.; SUAREZ, C. Ivermectin resistance in naturally *Cooperia* sp. infected heifers in Lara State, Venezuela. In: *International Seminar in Animal Parasitology*, 5, 2003. Merida, Mexico, p.67-71, 2003.
- CUTULLÉ, C.; EDDI, C.; CARACOSTANTOGOLO, J. *et al.* Métodos in vitro para el diagnóstico de resistencia antihelmíntica. *Vet. Arg.*, v.16, n.157, p.514-521, 1999.
- DELAUNE, E. Observation on the bovine blood picture in health and under parasitism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.* v. 41, p. 482-483, 1939.
- DIDIER, A.; LOOR, F. The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anti-Cancer Drugs.* v.7, n.7, p.745-751, 1996.
- EAGLESON J.S.; BOWIE, J.Y. Oxfendazole resistance in *Trichostrongylus axei* in cattle in Australia. *Vet. Rec.*, v. 119, p. 604, 1986.

ECHEVARRIA, F. Resistência à anti-helmínticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro, 2002.

EDDI, C.; BIANCHIN, I.; HONER, M.R. *et al.* Efficacy of doramectin against field nematode infections of cattle in Latin América. *Vet. Parasitol.* v.49, p.39-44, 1993.

EDDI, C.; NARI, A., CARACOSTANTOGOLO, J. Use of Macrocytic Lactones to Control Cattle Parasites in South America. In: VERCRUYSSSE, J.; REW, R.S. (Ed.) *Macrocytic lactones in antiparasitic therapy.* Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 263 - 271.

EGERTON, J.R.; BIRNBAUM, J; BLAIR, L.S. *et al.* 22, 23 dihidroavermectin B1, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *Br. Vet. J.*, v. 136, p. 88-97, 1980.

EGERTON, J.R.; OSTILIND, D.A.; BLAIR, L.S. *et al.* Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1a component. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 15, n. 3, p. 372-378, 1979.

FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M. *Patologia Clínica Veterinária.* Belo Horizonte: Rabelo e Brasil, 1978. 279 p.

FIEL, C.A.; SAUMELL, C.A.; STEFFAN, P.E. *et al.* Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. *Vet. Parasitol.*, v.97, p. 211-217, 2001.

FIEL, C. A.; SAMUEL, C.A.; FUSÉ, P.E. *et al.* Resistencia antihelmíntica múltiple en bovinos de Argentina. In CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13, 2004, Ouro Preto. *Anais...* Ouro Preto:2004.

FISHER, M.H.; MROZIK, H. *Chemistry.* In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) *Ivermectin and Abamectin.* Nova York: Springer-Verlag, 1989. p. 2-3.

FONSECA, A.H.; PEREIRA, M.J.S. *Classificação e morfologia de nematóides em medicina Veterinária CDROM.* Seropédica, 2002

FORT DODGE, 2007. Disponível em: <http://www.fortdodge.com.br>. Acesso em: 01/02/2008.

FREITAS M.G. *Helminologia Veterinária.* Belo Horizonte: Rabelo, 1980. 396 p.

GASBARRE, L.C., SMITH, L.L., LICHTENFELS, J.R., *et al.* The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the U.S. In: AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY PARASITOLOGISTS PROCEEDINGS, 49, p. 24-28, Philadelphia, 2004.

GASBARRE, L. C.; SMITH, L. L. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle populations in the US. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 21st, 2007, Gent, *Anais...* Gent: WAAVP, 2007. p.197.

GEARY, T.G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitol.* v. 21, n. 11, p. 530-532, 2005.

GEERTS S.; BRANDT, J.; KUMAR, V.; BIESEMANS, L. Suspected resistance of *Ostertagia ostertagi* in cattle to levamisole. *Vet. Parasitol.* v. 23, p. 77-82, 1987.

GENTLEMAN, R.; IHAKA, R.; BATES, D.; *et al* Statistics Department of the University of Auckland. Disponível em: <http://www.r-project.org/>. Acessado em: 15 de setembro de 2007.

GILLEARD J.S. Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics. *Int. J. Parasitol.* v.36, p.1227-1239, 2006.

GORDON, H.M., WHITLOCK, H.V.A., New technique for counting nematodes eggs in sheep faeces. J. Coun. Sci. Ind. Res. Aust., n.12, p. 50-52, 1939.

GRISI, L; SCOTT, F.B.; COMENDOUROS, K. *et al.* Avaliação da eficácia anti-helmíntica e berricida dos produtos Virbamec (ivermectina 1%) e Virbamax (abamectina 1%) injetável em bovinos. A Hora Veterinária, n. 85, p. 24-27, 1995.

GUIMARÃES, M.P.; RIBEIRO, M.F.B.; FACURI-FILHO, E.J. *et al.* Strategic control of gastrointestinal nematodes in dairy calves in Florestal, Minas Gerais, Brazil. Veterinary Research Communications, v.24, p. 31-38, 2000.

HARNESS, E.; FITZSIMMONS, W.M.; SELLWOOD, S.A. Experimental *Haemonchus placei* infection in calves, blood pictures at tree levels of infection. J. Comp. Pathol. V. 80, n. 2, p. 173-177, 1970.

HENDRIX, C. M.; SIROIS, M. *Laboratory Procedures for Veterinary Technicians.* Elsevier Health Sciences, 2006.

HENNESSY, D.R.; ALVINERIE, M.R. Pharmacokintics of the Macrocytic Lactones: conventional wisdom and new paradigms. In: VERCRUYSSSE, J.; REW, R.S. (Ed.) Macrocytic lactones in antiparasitic therapy. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 97-119.

HONER, M.R., BRESSAN, M.C.R.V. Nematódeos de bovinos no Brasil. O Estado da Pesquisa, 1991. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. v. 1, n 1, p 67-79, 1992.

ANTERVET, Disponível em: <http://www.intervet.com.br>. Acesso em: 01/02/2007.

JACKSON, R.A.; TOWNSEND, K.G.; PYKE, C.; LANCE, D.M. Isolation of oxfendazole resistant *Cooperia oncophora* in cattle. N.Z. Vet. J. v. 35, p. 187-189, 1987.

KRAMER, J.W. Normal hematology of cattle, sheep, and goats. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. (Ed.) Schalm's Veterinary Hematology. Philadelphia: Lippincott, 2006. p. 1074.

LE JAMBRE, L. F. Le.; GALL, J.H.; LENANE, I.J. *et al.* Inheritance of avermectin resistance in *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol., v.30, p. 105-111, 2000.

JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology.* Philadelphia: Lea & Febiger, p. 417, 1993.

JUNG, M; SAITO, A.; BÖESCHER, G. *et al.* Chemistry, pharmacology and safety: Milbemycin Oxime. In: VERCRUYSSSE, J.; REW, R.S. (Ed.) Macrocytic lactones in antiparasitic therapy. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 51-74.

KANOBCMA, K. Experimental *Cooperia oncophora* infections in calves: an insight into host-parasite interactions. 2003. 168 p. Thesis Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University.

KAPUSNIK-UNER, J.E.; SANDE, M.A.; CHAMBERS, S.H.F. Fármacos antimicrobianos. In: GILMAN, A.G. (Ed.) As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. p. 835.

LANKAS, G.R.; GORDON, L.R. Toxicology. In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) Ivermectin and Abamectin. Nova York: Springer-Verlag, 1989. p. 102-107.

LEATHWICK, D.M.; MOEN I.C.; MILLER C.M. *et al.* Ivermectin-resistant *Ostertagia circumcincta* from sheep in the lower North Island and their susceptibility to other macrocytic lactone anthelmintics. N.Z.Vet. J. v. 48, n. 5, p. 151-154, 2000.

LEITE, A.C.R.; GUIMARÃES, M.P.; COSTA, J.O. *et al.* Curso natural de infecções helmínticas gastrintestinais em bezerros. Pesq. Agrop. Bras., v.6, n.16, p.891 – 894, 1981.

- LEITE, R.C.; CAPRONI JR., L.; MORO, E. *et al.* Comparative efficacy of efficacy of program use of two doses of doramectin and ivermectin in the control of endo- and ectoparasite infestations and their effects on productivity of fattening cattle. In: INTERNATIONAL CONFERENCE WAAVP, 16. p.13. Sun City. 1997.
- LESPINE, A.; BARTLEY, D; DUPUY, J. ALVINERE, M. JACKSON, F. P-gp interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in nematode ivermectin-resistant strains. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 21st, 2007, Gent, Anais...Gent: WAAVP, 2007. p.396
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; BALLENT, M. *et al.* Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: Absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Vet parasitol.* v. 147, p. 303-310, 2007.
- LIMA, W.S. Efeito de tratamentos anti-helmínticos sobre o comportamento estacional das infecções helmínticas gastrintestinais de bezerros. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1980, 106p (Tese de Mestrado).
- LIMA, J.D.; MUNIZ, R.A.; LIMA, W.S. *et al.* Eficácia de doramectin contra nematódeos gastrintestinais e pulmonares de bovinos naturalmente infectados de Minas Gerais. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.1, n.4, p. 49-52, 1995.
- LIMA, W.S. Controle de endo e ectoparasitos e relação custo/benefício em novilhas de rebanhos leiteiros em Minas Gerais. *A Hora Veterinária*, ano 15, n. 85, 1995.
- LIMA, W.S.; FAKURI, E.; GUIMARÃES, M.P. *et al.* Dinâmica das helmintoses de bovinos de leite na região metalúrgica de Minas Gerais. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.6, n.2, p. 97-103, 1997.
- LLOYD, J; FISCHER, T.; PAGE, S. Advances in parasite control & target discovery. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 20th, 2005, Christchurch, Anais... Christchurch: WAAVP, 2005. p.12.
- MCKENNA, P.B. Resistance to benzimidazole anthelmintics in cattle in New Zealand. *N.Z. Vet. J.* v. 38, p. 4-6, 1991.
- MELO, A.C.F.L.; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C.M.L. Comparação de testes in vivo e in vitro para detecção de resistência anti-helmíntica em nematódeos de pequenos ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: 2002.
- MELO, H.J.H.; BIANCHIN, I. Estudos epidemiológicos de infecções por nematódeos gastrintestinais de bovinos de corte em zona de cerrado de Mato Grosso. *Pesq. Agrop. Bras.*, Brasília, v. 12 , p. 205 – 16, 1977.
- MERIAL, Disponível em: <<http://www.merial.com.br>>. Acesso em: 01/11/2007.
- MERIAL Our history. Disponível em: <http://www.merial.com/company_history/index.asp>. Acesso em: 10/01/2008.
- MEEUS, P.F.M.; DE BONT, J.; VERCROYSSSE, J. Comparison of the persistent activity of ivermectin, abamectin, doramectin and moxidectin in cattle in Zambia. *Vet. Parasitol.*, v.70, p.219-224, 1997.
- MCARTHUR, M.J.; LOVERIDGE, I.B.; MCKENNA, P.B. *et al.* Probable multigeneric resistance to macrocyclic lactone anthelmintic in cattle in New Zealand. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 20th, 2005, Christchurch, Anais... Christchurch: WAAVP, 2005. p.20.

- MCKENNA, P.B. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in New Zealand: Is it increasing? *New Zeal. Vet J.*, v. 44, p. 76, 1996.
- MOLENTO, M.B., WANG G.T., PRICHARD R.K. Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *Haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations. *Veterinary Parasitology* n.86, p. 77-81, 1999.
- MONTEIRO, A.M.; WANYANGU, S.W.; KARIUKI, D.P.; BAIN, R.; JACKSON, F.; MCKELLAR, Q.A. Pharmaceutical quality of anthelmintics sold in Kenya. *Vet. Rec.*, v.142, p.396-398, 1998.
- MOTTIER, L; LANUSSE, C. Bases moleculares de la resistência a fármacos anti-helmínticos. *Rev. Med. Vet.*, v.82, n.2, p.74-85, 2001.
- MOTTIER, M. L.; PRICHARD, R.K. Macrocyclic lactones selection on beta-tubulin in *Haemonchus contortus*: Implications for cross-resistance selection to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 21st, 2007, Gent, Anais... Gent: WAAVP, 2007. p.167.
- NASCIMENTO, A.A.; VASCONCELOS, O.T.; BORGES, F.A. *et al.* Atividade anti-helmíntica de uma nova formulação de longa ação contendo ivermectina 2,25% + abamectina 1,25%, no tratamento de bovinos naturalmente infectados por nematódeos parasitos. *A Hora Veterinária*, n.5 edição extra. p. 33-36, 2003.
- NICOLAU, C.V.J., AMARANTE, A.F.T., ROCHA, G.P. *et al.* Relação entre desempenho e infecções por nematódeos gastrintestinais em bovinos Nelore em crescimento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 54, n.4, p.351-357. 2002.
- NOVARTIS, 2007. Disponível em: <http://www.novartis.com.br>. Acesso em: 01/12/2007.
- O'KELLY, J.C. Parasitism and blood composition in genetically different types of cattle grazing in a tropical environment. *Vet. Parasitol.* v. 6, p. 381-390, 1980.
- ÔMURA, S. The ivermectin story. Disponível em <<http://www.satoshi-omura.info/ivermectin/index.html>> 2007. Acesso em 25/12/2007.
- OURO FINO, 2007. Disponível em: <http://www.ourofino.com.br>. Acesso em: 01/12/2007.
- PAES-OLIVEIRA, F. SOUTELLO, R. V. G.; ZOCOLLER-SENO. M.C; *et al.* Eficiência anti-helmíntica de diferentes formulações de endectocidas em novilhas naturalmente infectadas. In CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14, 2006, Ribeirão Preto. Anais...Ribeirão Preto:2006.
- PAIVA, F.; SATO, M.O.; ACUÑA, A.H. *et al.* Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. *A Hora Veterinária*, n.120, p. 1-4, 2001.
- PFIZER. Disponível em: <<http://pfizersaudeanimal.com.br/2008>>. Acesso em: 05/01/2008.
- PIACENTI, A. K.; AMARAL, M.T.; LIMA. M.M. Resistência de nematodos gastrintestinais de bovinos a ivermectina. In CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14, 2006, Ribeirão Preto. Anais...Ribeirão Preto:2006.
- PINHEIRO, A.C.; ECHEVARRIA, F.A.M. Susceptibilidade de *Haemonchus* sp. em bovinos ao tratamento anti-helmíntico com albendazole e oxfendazole. *Pesq. vet. bras.* v.10, n.1/2, p. 19-21, 1990.
- PINTO, C. Zoo-parasitos de interesse Médico e Veterinário. Editora Científica, 1945, p. 441.

- PRESIDENTE, P.J.A. Methods for detection of resistance to anthelmintics. In: ANDERSON; N.; WALLER, P.J. (Ed.) Resistance in nematodes to anthelmintic drugs. Melbourne: CSIRO, 1985. p.13-27.
- RANGEL, V.B.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R. Resistência de *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp. às avermectinas em bovinos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.2, p.186-190, 2005.
- ROBERTS, F., O'SULLIVAN, P. Methods for eggs counts and larvae cultures for strongyles infesting gastrointestinal tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.*, n.1, p. 99-102, 1949.
- ROBERSON, E.L. Drogas utilizadas contra nematódeos. In: BOOTH, N.H.; McDonald, L.E. (Ed.) Farmacologia e terapêutica em veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p.740-741.
- ROCK, D. W.; DELAY, R. L.; GLIDDON, M.J. Chemistry, Pharmacology and Safety: Moxidectin. In: VERCRUYSSSE, J.; REW, R.S. (Ed.) Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 75-96.
- RODRIGUES, E. P. Produtores lucram com o controle da verminose. EMBRAPA. Disponível em <http://www.sct.embrapa.br/radio/2004/abordagem/release_verminose.htm>. Acessado em: 01 de agosto de 2007.
- RODRIGUES, D.C.; BUZZULINI, C.; SANTANA, A.E.; SANTOS, T.R.; BERGAMIN, L.K.S.; ARANTES, T.P.; SANTOS, E.; COSTA, A.J. Toxicity evaluation of a 2,25% ivermectin + 1,25% abamectin solution in calves younger than four months of age. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 21st, 2007, Gent, Anais...Gent: WAAVP, 2007. p.293.
- ROSENTHAL, H. Antiparasitário Ivermectin ganha nova fórmula. Disponível em: http://www2.uol.com.br/JC/_1998/2209/ec2209n.htm acesso em 10/03/2008.
- ROSS, J.G.; ARMOUR, J. The significance of faecal egg counts and the use of serum albumen levels and packed cell volume percentages to assess pathogenicity of helminthiasis. *Vet. Rec. V. 72*, n. 8, 1960.
- ROULET, A.; PRICHARD, R.K. P-glicoproteins in *Haemonchus contortus*: Ivermectin and moxidectin select for constitutive overexpression and induce further overexpression of P-glicoproteins. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 21st, 2007, Gent, Anais...Gent: WAAVP, 2007. p.167.
- SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte, Fundação de ensino e pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 1998, p. 221.
- SANGSTER, N.C. Managing parasiticide resistance. *Vet. Parasitol.*,v.98, p. 89-109, 2001.
- SANTOS, V.T. Avaliação dos prejuízos causados pelas helmintoses em bovinos de criação extensiva em zona rural da depressão central. *Rev. Centro Ciências Rurais*, v.3, n. 1-4, p 61-70, 1973.
- SANTOS, E.; BORGES, F.A.; CHO, H.S. *et al.* Farmacocinética de uma nova formulação de longa ação contendo ivermectina 2,25% + abamectina 1,25% em bovinos. *A Hora Veterinária*, n.5 edição extra. p. 6-11, 2003.
- SCIAVICCO, C.J.S. *Influência da infecção natural por helmintos gastrintestinais sobre o quadro hematológico de bezerras mestiças Holandês x Zebu.* 1996. 128p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

SEAMAN, J.T.; EAGLESON, J.S.; CARRIGAN, M.J.; WEBB, R.F. Avermectin B1 toxicity in a herd of Murray Grey cattle. *Australian Veterinary journal*, v. 64, n. 9, p. 284-285, 1987.

SEIFERT, G.W. Ecto and encoparasitic effects on the growth rates of zebu crossbred and British cattle in the field. *Aut. J. Agric. Res.* V. 22, p. 839-850, 1971.

SENADO FEDERAL, disponível em <http://www.senado.gov.br/sf/atividade/Materia/Detalhes.asp?p_cod_mate=71939&p_sort_tr=Asc> Acessado em 01/03/2007.

SHOOP, W.; SOLL, M. Chemistry, pharmacology and safety of the macrocyclic lactones: Ivermectin, Abamectin and Eprinomectin. In: VERCRUYSSSE, J.; REW, R.S. (Ed.) *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 14-16.

SINDAN 2007a, disponível em <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>> acesso em 01/02/2008.

SINDAN 2007b, disponível em <<http://www.cpv.com.br/cpv/index.html>> acesso em 01/02/2008.

SOUTELLO, R.V.G.; ZOCOLLER-SENO, M.C.; AMARANTE, A.F.T. et al. Resistência anti-helmíntica em rebanhos de bovinos de corte na região do no estado de São Paulo. In CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13, 2004, Ouro Preto. *Anais...Ouro Preto:2004*.

SOUZA, A.P.; RAMOS, C.I.; DALAGNOL, C. et al. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. *Anais...Rio de Janeiro: 2002*.

SOUZA, A.P.; RAMOS, C.I.; DALAGNOL, C. et al. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos à anti-helmínticos no planalto catarinense. In CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13, 2004, Ouro Preto. *Anais...Ouro Preto:2004*.

STEAR, M.J.; HENDERSON, N. G.; KERR, A. et al Eosinophilia as a marker of resistance to *Teladorsagia circumcincta* in Scottish Blackface lambs. *Parasitology* 2002 124, 553-560.

SUAREZ, V.H.; CRISTEL, S.L. Anthelmintic resistance in cattle nematode in the Western Pampeana Region of Argentina. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 20th, 2005, Christchurch, Anais... Christchurch: WAAVP, 2005. p.18.

SUAREZ, V.H.; CRISTEL, S.L. Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. *Vet. Parasitol.* v.144, p. 111-117, 2007.

TAYLOR, S.M.; STANG, J.P; KENY, J. Persistent efficacy of doramectin and moxidectin against *Cooperia oncophora* infections in cattle. *Vet. Parasitol.*, v. 96, p. 323-328, 2001.

TAYLOR, M.A., HUNT K.R., GOODYEAR K.L. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*. n.103, p. 183-194, 2002.

TIZARD, I. *Imunologia Veterinária*. São Paulo. Roca. 1998, p.333-341.

TOUTAIN, P.L.; UPSON, D.W.; TERHUNE, T.N. et al. Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in cattle. *Vet. Parasitol.*, v.72, p.3-8, 1997.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. *Manual de diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. Japan International Cooperation Agency, 1998, p.166.

VAN WYK, J.A., MALAN, F.S. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide, and the benzimidazoles in South Africa. *Veterinary Record*. n.123, p. 226-228, 1988.

VIEIRA, S. *Introdução à Bioestatística*. Rio de Janeiro; Editora Campus, 1988, p. 293.

VERCRUYSSSE, 2000 VERCRUYSSSE, J.; DORNY, P.; CLAEREBOU, E. *et al.* Evaluation of the persistent efficacy of doramectin and ivermectin injectable against *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in cattle. *Vet. Parasitol.*, v. 89, p.63-69, 2000.

VERMUNT, J.J.; WEST, D.M.; POMROY, W.E. Inefficacy of moxidectin and doramectin against ivermectin-resistant *Cooperia* sp. of cattle in New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, v. 44, p. 188-193, 1996.

VIANA, E.S.; CAMPOS, J.M. Estudo de hemograma em bezerros com controle parasitológico e bezerros com verminose gastrointestinal naturalmente adquirida. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v. 26, n. 2, p. 121-126, 1974.

WATSON, T.G.; HOSKING, B.C.; MCKEE, P.F. Preliminary evidence of multiple anthelmintic resistance in Friesian bull beef weaners in New Zealand. *New Zeal. J. Zoo*, v.22, p.183-184, 1995.

WHITLOCK, J.H. Parasitology, biometry and ecology. *Brit. Vet J.* v.117, p. 337-348. 1961.

WILLIAMS, J.C.; LOYACANO, A.F.; BROUSSARD, S.D. *et al.* Duration of anthelmintic efficacy of doramectin and ivermectin injectable solution against naturally acquired nematode infestations of cattle. *Vet. Parasitol.*, v.72, p.15-24.1997.

WILLIAMS, J.C.; LOYACANO, A.F.; DEROSA, A. *et al.* A comparison of persistent anthelmintic efficacy of topical formulations of doramectin, ivermectin, eprinomectin and moxidectin against naturally acquired nematode infections of beef cattle. *Vet. Parasitol.*, v.85, p.277-288, 1999.

WOOD, I.B.; AMARAL, N.K.; BAIRDEN, K. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*. n.58, p. 181-213, 1995.

XU, M.; MOLENTO, M.; BLACKHALL, W. *et al.* Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.91, p. 327-335, 1998.

ANEXO I

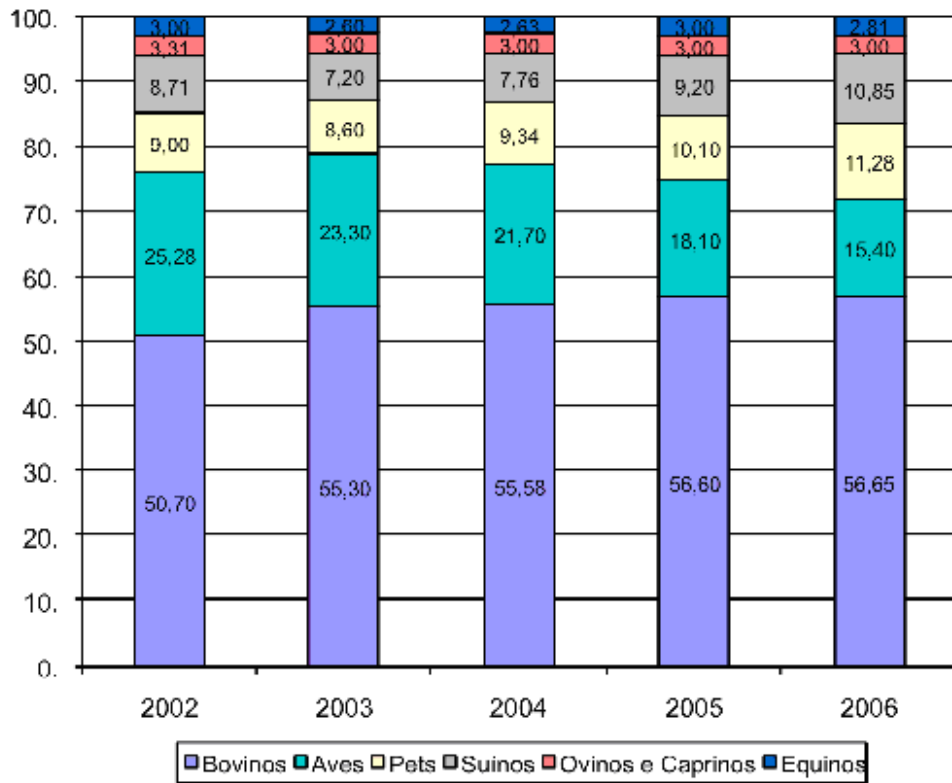


Figura 3 - Participação das espécies animais no faturamento do mercado farmacêutico veterinário, Brasil, 2007. Adaptado de Sindan, 2007a.

ANEXO II

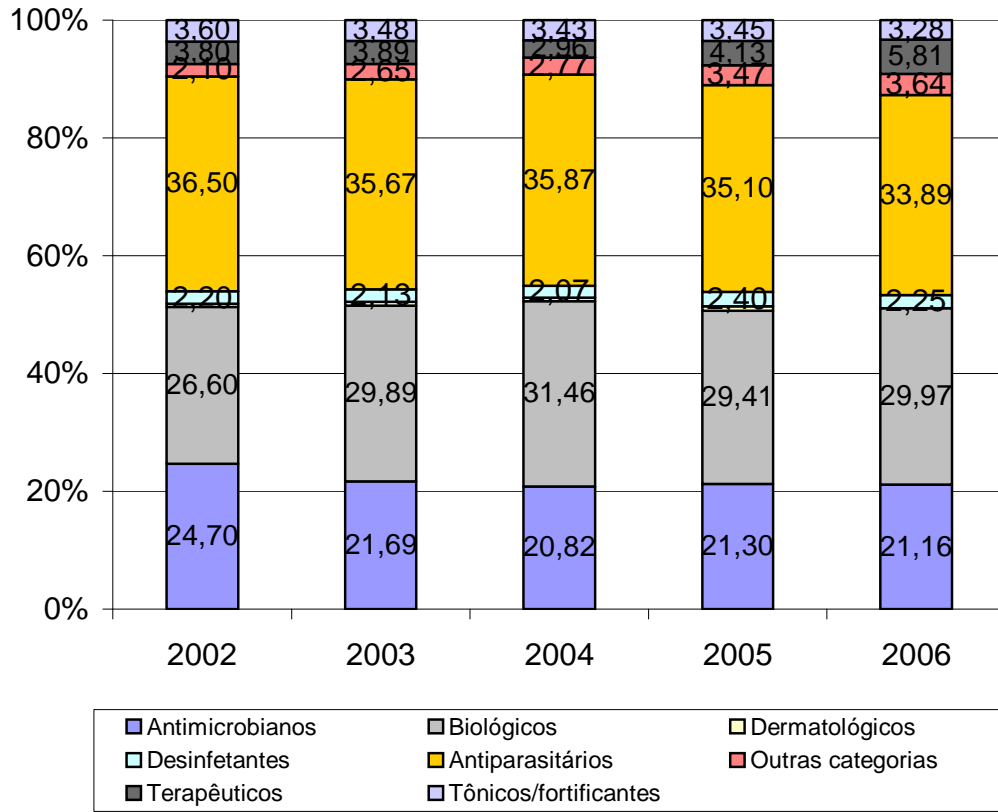


Figura 4 - Participação das classes terapêuticas no faturamento do mercado farmacêutico veterinário, Brasil, 2007. Adaptado de Sindan, 2007a.

ANEXO III

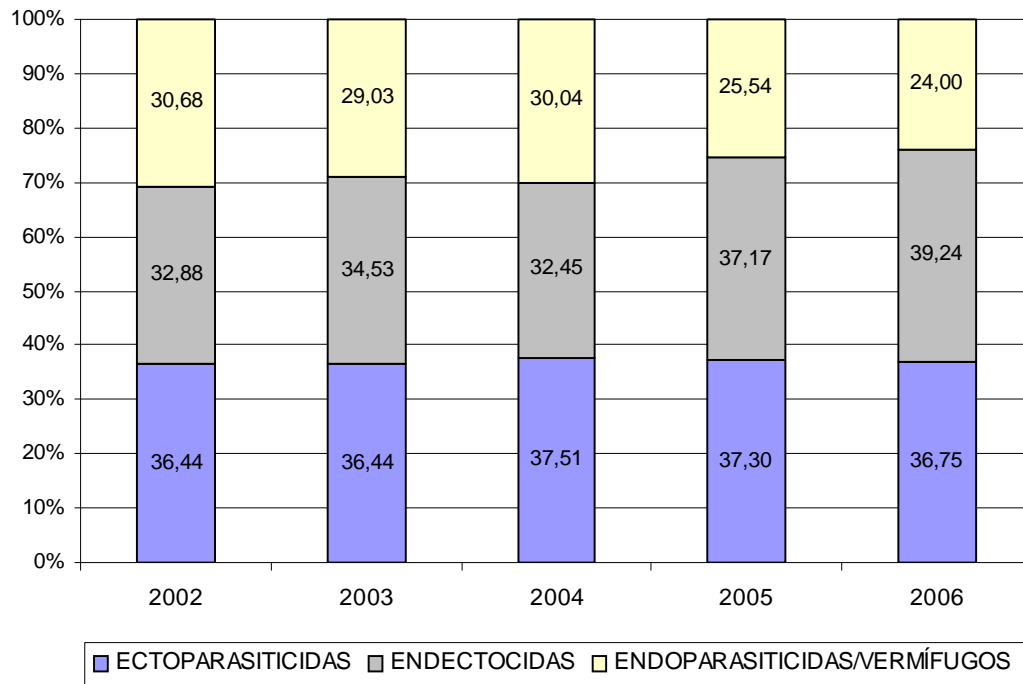


Figura 5 - Participação das classes terapêuticas no faturamento de antiparasitários do mercado farmacêutico veterinário, Brasil, 2007. Adaptado de Sindan, 2007a.

ANEXO IV

Valores individuais das contagens de leucócitos totais (mil/ μ L), monócitos (μ L), linfócitos (μ L), eosinófilos (μ L), neutrófilos segmentados (μ L) e neutrófilos bastonetes (μ L), média aritmética e desvio padrão, em bovinos mestiços infectados artificialmente com larvas de helmintos, avaliados no dia da infecção (dia 0). Vitória – ES, 2007.

Animal	Leucócitos totais	Monócitos	Linfócitos	Eosinófilos	Neutrófilos segmentados	Neutrófilos bastonetes
45	*14,10	141	*10.293	141	3.525	0
46	*12,20	*1.586	6.832	122	3.660	0
48	27,50	*1.100	*22.000	825	3.575	0
49	8,10	648	5.589	162	1.701	0
55	*12,40	248	*8.804	0	3.348	0
57	9,70	485	7.081	194	1.940	0
59	11,45	115	*8.015	229	3.092	0
61	12,00	480	*9.240	360	1.920	0
62	9,95	*1.095	6.368	398	2.090	0
63	9,10	546	4.732	637	3.185	0
64	11,30	678	6.102	339	*4.181	0
65	11,90	*952	5.712	1.904	3.332	0
66	*14,00	280	*9.100	700	3.920	0
68	9,70	388	6.111	388	2.813	0
70	*13,90	*1.529	*7.784	278	*4.309	0
72	10,90	327	7.303	109	3.161	0
73	*12,10	*1.210	6.776	121	3.993	0
74	10,80	648	5.616	216	*4.320	0
76	10,00	400	7.400	400	1.800	0
82	*12,50	375	*7.750	875	3.500	0
83	*15,65	*1.096	6.730	626	*7.199	0
86	11,85	356	*8.177	356	2963	0
88	7,60	380	5.776	76	1.368	0
92	11,30	678	*8.927	226	1.469	0
95	9,70	*1.358	5.335	194	2.813	0
97	10,80	*864	6.588	324	3.024	0
98	11,25	*1.125	6.863	0	3.263	0
99	11,40	456	*8.436	456	2.052	0
Média	11,90	697,93	7.694,23	380,55	3.125,50	0,00
Desvio Padrão	3,54	420,83	3.114,91	377,76	1.182,57	-

*Valores acima do valor máximo de referência, Kramer (2006).

ANEXO V

Valores individuais das contagens de leucócitos totais (mil/ μ L), monócitos (μ L), linfócitos (μ L), eosinófilos (μ L), neutrófilos segmentados (μ L) e neutrófilos bastonetes (μ L), média aritmética e desvio padrão, em bovinos mestiços infectados artificialmente com larvas de helmintos, avaliados no dia 46 pós-infecção. Vitória – ES, 2007.

Animal	Leucócitos totais	Monócitos	Linfócitos	Eosinófilos	Neutrófilos segmentados	Neutrófilos bastonetes
45	*15,05	301	*11.890	452	2.408	0
46	10,70	214	*8.346	107	2.033	0
48	*12,60	504	*9.954	252	1.890	0
49	*14,25	*1.283	*7.553	0	*5.415	0
55	10,00	200	7.000	400	2.400	0
57	7,85	393	5.417	79	1.963	0
59	10,35	414	*7.763	0	2.174	0
61	*15,60	780	*12.792	312	1.716	0
62	9,65	0	6.659	869	2.123	0
63	9,45	662	4.442	95	*4.253	0
64	*14,60	438	*8.322	0	*5.840	0
65	8,65	260	6.574	606	1.211	0
66	*14,55	*1.019	*8.585	728	*4.220	0
68	*13,25	*1.325	5.963	0	*5.963	0
70	8,55	257	6.413	342	1.539	0
72	*12,95	0	*9.713	130	3.108	0
73	10,15	508	7.105	406	2.132	0
74	6,75	675	4.658	0	1.418	0
76	9,50	950	6.555	190	1.805	0
82	7,95	159	5.088	875	1.829	0
83	*12,35	371	*8.275	0	3.705	0
86	10,00	300	*7.700	200	1.800	0
88	8,20	410	6.806	0	984	0
92	9,15	549	5.490	0	3.111	0
95	9,60	288	*7.584	96	1.632	0
97	10,00	400	7.300	600	1.700	0
98	*12,50	250	*10.000	0	2.250	0
99	9,50	1.140	7.030	190	1.140	0
Média	10,85	501,64	7534,68	247,32	2562,79	0,00
Desvio Padrão	2,46	358,05	1.985,87	274,43	1.393,58	-

*Valores acima do valor máximo de referência, Kramer (2006).