

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA AO
MONEPANTEL EM PROPRIEDADES DE OVINOS DE UMA
MICRORREGIÃO EM TORNO DE JABOTICABAL-SP**

Aline Carvalho Martins

Médica Veterinária

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA -UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA AO
MONEPANTEL EM PROPRIEDADES DE OVINOS DE UMA
MICRORREGIÃO EM TORNO DE JABOTICABAL-SP**

Aline Carvalho Martins

Orientador: Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

2016

Martins, Aline Carvalho
M379e Estudo de resistência anti-helmíntica ao monepantel em propriedades de ovinos de uma microrregião em torno de JABOTICABAL-SP. / Aline Carvalho Martins. – – Jaboticabal, 2016 ix, 61 p. :il.; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Estevam Guilherme Lux Hoppe
Banca examinadora: Adjair Antônio do Nascimento, Paulo Alécio Canola, Daniel Cortes Beretta, José Ribamar Privado Filho
Bibliografia

1. Derivados da aminoacetoneitrila. 2. Eficácia. 3. *Haemonchus contortus*. 4. Nematóide. 5. OPG. 6. Teste crítico. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.99:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DOS CURRICULARES DO AUTOR

A autora, Aline Carvalho Martins, nasceu em Jataí-GO em 1982, onde cursou graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás no período compreendido de 2000 a 2004. Saiu de sua cidade natal no último período do curso e foi fazer estágio obrigatório na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia onde desenvolveu também a parte experimental de seu mestrado cujo orientador era pesquisador desta instituição, Dr. Roberto Sartori Filho. Foi aluna regular da pós-graduação em medicina veterinária da Unesp, Campus de Botucatu. O mestrado se iniciou em março de 2005 e terminou em junho de 2007. Posteriormente, trabalhou como professora na Universidade Estadual de Goiás e na Universidade Federal de Goiás, ambas localizadas em Jataí-GO. Após este período, foi contratada na Universidade de Rio Verde (UniRV) em janeiro de 2009, iniciando o doutorado interinstitucional UniRV/Unesp em janeiro de 2012 sob a orientação do Professor Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe. Em janeiro de 2015 foi efetivada em concurso público para professor das disciplinas Parasitologia e Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos na UniRV.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus pela vida e por me manter com a mente e corpo saudáveis e protegida de qualquer mal.

Agradeço aos homens da minha vida, Stefen (marido) e Gabriel (filho) por todo apoio em todos os momentos e compreensão por tantas ausências. Algumas vezes eu estava de corpo presente, porém distante em pensamentos e outras eu estava distante, mas sempre com vocês em meus pensamentos.

Aos meus pais Luiz Elias e Liane, que sempre me apoiaram em minhas decisões e participaram de todos os momentos bons e ruins. Em nome do Durval e da Maria Vitória, que são os grandes responsáveis pelos valores familiares e de cidadania, agradeço a toda família Carvalho.

Agradeço toda a minha família que é tudo pra mim e também a família de meu marido, em especial minha sogra e meu sogro (Rosa Maria e Pedro) que me deram muito apoio durante o período de doutorado.

De forma mais que especial agradeço ao meu orientador Estevam, por ter aceitado ser meu orientador sem nem me conhecer e por ter sido mais que orientador, sendo professor e amigo. Quero que nossa amizade dure para sempre!!

Agradeço os Coordenadores do DINTER, Professor José Jurandir Fagliari (Unesp) e Professor José Ribamar Privado Filho (UniRV) pela dedicação para viabilizar este programa de doutorado. E assim agradeço a UNESP de Jaboticabal e a UniRV.

Agradeço toda a equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UNESP Jaboticabal, e de forma muito especial ao José Hairton Tebaldi que foi a cabeça que mais pensava entre tantas, e com toda sua educação e boa vontade me ensinou muitas coisas.

Aos alunos de graduação e pós-graduação que estavam envolvidos nas atividades do Laboratório de Doenças Parasitárias da UNESP Jaboticabal, os quais prefiro não escrever os nomes pra não me esquecer de ninguém. Este costume de chamar as pessoas por apelido faz com que não saibamos bem os nomes.

Aos colegas de DINTER Amanda Carla Acipreste Galvão, Cheston Cesar Honorato Pereira, Cinthia Yukio dos Santos, Ednea Freitas Portilho, Giancarlo Costi, Paulo

Vinicius da Costa Mendes, Rejane Guerra Ribeiro e Tales Dias do Prado, se não fosse a vontade e empolgação de cada um, esse grupo não tinha se formado. Obrigado por dividir os bons momentos e as angústias do período de doutorado, que só nós sabemos.

Agradeço aos colegas de trabalho José Ribamar Privado Filho, Cristiane Raquel Dias Francischini, Daniel Beretta, Juliana Olivencia Ramalho Nunes e Carolina Rocha e Silva, pelo apoio nas partes escrita e prática e por serem amigos nos momentos de desespero!!!

Não poderia me esquecer de agradecer aos alunos de medicina veterinária da UniRV, pelo grande apoio. De forma especial agradeço os alunos Adriel Freitas Laurindo, Tamyris Furtado de Lima e Fernanda Magalhães de Souza que estiveram comigo em Jaboticabal e foram grandes companheiros. Os alunos que eram da equipe do projeto de doutorado e depois continuaram juntos formando o Grupo de Estudos de Ruminantes da Faculdade de Medicina Veterinária da UniRV (Rumivet), sendo eles, Adriel, Tamyris, Benar Silva, Franciely Paludo, Gilmar Arantes Ataíde Junior, Letícia Souza Prates, Luiz Micheletti Filho, Murilo da Silva Freitas, Sarah Carvalho Oliveira Lima. E ainda três queridos alunos que não fazem parte do Rumivet, mas que estiveram nesta equipe, Felipe Barbosa, Renato Picolli e Thalia Fernandes Rezende. Vocês terão sempre um lugarzinho guardado no meu coração, pois vivemos muitos momento bons. Esta equipe já começou a se desfazer mas todos deixarão uma sementinha plantada para os outros que virão.

À banca examinadora da qualificação composta pelos professores Paulo Alécio Canola, Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, Daniel Beretta e José Ribamar Privado Filho que contribuíram para elaboração da tese.

À banca examinadora da defesa Daniel Beretta, José Ribamar Privado Filho, Adjair Antônio do Nascimento, Paulo Alécio Canola por terem aceito o convite.

À CAPES pelo auxílio financeiro do projeto e também pela bolsa de estudos.

SUMÁRIO

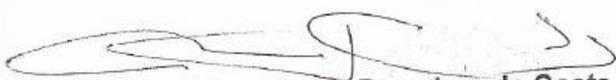
	página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Anti-helmínticos.....	3
2.2 Farmacocinética e farmacodinâmica do monepantel.....	5
2.3 Resistência anti-helmíntica.....	6
2.4 Resistência anti-helmíntica ao monepantel.....	9
3.OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Situação de resistência do anti-helmíntico monepantel em propriedades de ovinos em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP.....	13
4.2 Testes da eficácia do monepantel em ovinos experimentalmente infectados com um isolado de <i>Haemonchus contortus</i>	17
4.3 Análise dos dados.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Situação de resistência do anti-helmíntico monepantel em propriedades de ovinos em uma microrregião em torno de Jaboticabal- SP.....	24
5.2 Testes da eficácia do monepantel em ovinos experimentalmente infectados com um isolado de <i>Haemonchus contortus</i>	38
6. CONCLUSÃO.....	42

7. REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO 1- ROTEIRO PARA LEVANTAMENTO DO HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO DO ZOLVIX E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS.....	49
ANEXO 2 - ARTIGO: Resistência de <i>Haemonchus contortus</i> ao monepantel em ovinos: testes de eficácia através de redução de contagem de ovos e controlado randomizado.....	50

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**unesp** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 021764/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Investigação das helmintoses, situação de resistência a anti-helmínticos e fatores de risco associados em ovinos criados na região sudoeste de Goiás"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de outubro de 2013.

Jaboticabal, 08 de outubro de 2013.


Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa
Vice-Coordenador - CEUA

ESTUDO DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA AO MONEPANTEL EM PROPRIEDADES DE OVINOS DE UMA MICRORREGIÃO EM TORNO DE JABOTICABAL-SP

RESUMO – O monepantel, anti-helmíntico de uma nova classe, foi desenvolvido e colocado no mercado recentemente, como solução para criações com helmintos de ovinos multirresistentes. Após pouco tempo de utilização, foram relatados casos de resistência contra o produto. Objetivou-se avaliar o perfil de resistência ao monepantel em criações de ovinos em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP e caracterizar experimentalmente a resistência ao monepantel em isolado de *Haemonchus contortus*. Foi realizado o teste de redução de ovos em dez propriedades ovinocultoras próximas a Jaboticabal/SP, identificando a eficácia do monepantel e levantando o histórico da utilização do produto para determinação de fatores de risco associados à resistência. Obteve-se isolado de *H. contortus* resistente para teste crítico. Após coleta de fezes dos animais oriundos de propriedade onde o vermífugo foi ineficaz, obteve-se larvas infectantes que foram inoculadas em dois doadores para obtenção de fêmeas de *H. contortus*. Larvas infectantes deste isolado foram inoculadas em dez animais. Após confirmada a patência, cinco animais receberam monepantel, grupo tratamento, e cinco não receberam, grupo controle. Exames de OPG foram realizados nos dias 0 (dia do tratamento), 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 e os animais eutanasiados no dia 14, avaliando o número de *H. contortus* no abomaso dos animais dos dois grupos. Revelou-se que em duas propriedades o monepantel foi ineficaz, em duas foi eficaz e nas outras seis foi altamente eficaz. Os principais fatores predisponentes detectados foram: intervalos curtos entre vermifugações, não alternância com outras bases químicas, tratamento massivo, raça e intensificação da criação. Observou-se *H. contortus* resistente após realização do teste crítico com eficácia de 24,65%. Conclui-se que helmintos de ovinos já estão resistentes ao monepantel em criações brasileiras localizadas no estado de São Paulo, especialmente o *H. contortus*.

Palavras-chave: derivados da aminoacetona, eficácia, *Haemonchus contortus*, nematóide, OPG, teste crítico

**ANTHELMINTIC RESISTANCE STUDY TO MONEPANTEL AT SHEEP
PROPERTIES LOCATED ON A MICRRORREGION AROUND JABOTICABAL-
SP**

ABSTRACT – Monepantel, anthelmintic of a new class, was recently developed and released to the international market, it was presented as a solution for properties with multirresistant helminthes. However, with little time utilization, were related cases of resistance against this product. The objectives of this work were evaluate the resistance profile of monepantel on sheep creations at a microregion around Jaboticabal-SP and characterize experimentally the monepantel resistance on *Haemonchus contortus* isolate. Initially, was accomplished egg count reduction test at ten ovine properties located around Jaboticabal-SP, identifying the monepantel efficacy and investigating the history of product use for determination risk factors resistance associated. Posteriorly, a *H. contortus* resistant isolate was obtained for the critic test. After animals collect stoll of a resistance suspected proprierty, there were obtained infective larvae that were inoculated on two donors for females of *H. contortus* obtainment and after, infective larvae production for inoculation in ten animals. After patency confirmed, five animals received monepantel, treatment group, and five didn't receive, control group. The treatment day was day 0. Fecal egg counts were performed on days 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 and the animals were euthanized on day 14, evaluating the *H. contortus* number in the sheep abomaso of both groups. The results of the firts part study revealed the monepantel was ineffective in two properties, was effective in two properties and highly effective on six properties. The risk factors detected were: short interval between anthelmintic treatments, no alternation with other chemical bases, massive treatment, breed, intensification of creation. In a second step, was observed *H. contortus* resistant after performed the critic test, with an efficacy of 24,65%. We concluded that sheep helminths are already monepantel resistant in brazilian creations located at São Paulo state, especially *Haemonchus contortus*.

Key words: amino-acetonitrile derivative, efficacy, *Haemonchus contortus*, EPG, critic test

LISTA DE ABREVIATURAS

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

OPG- ovos por grama de fezes

D0 – dia do tratamento com monepantel

D14 – quatorze dias após tratamento com monepantel

PBS - phosphate buffered saline

L3 – larva infectante ou larva de terceiro estágio

N/A – não se aplica

GI- grupo I (controle)

GII – grupo II (tratado com monepantel)

P - propriedade

LISTA DE TABELAS

	página	
Tabela 1	Localizações e caracterização dos sistemas de criação e das raças criadas em dez propriedades ovinocultoras na microrregião ao redor de Jaboticabal-SP que foram utilizadas no estudo da situação de resistência do monepantel.....	14
Tabela 2	Caracterização do tamanho das criações de ovinos da microrregião ao redor de Jaboticabal-SP. Descrição do número de animais utilizados no teste de redução de ovos (OPG ≥ 1000) cuja amostragem foi realizada selecionando os animais das propriedades com maior probabilidade de estar com alta contagem de ovos por grama de fezes.....	16
Tabela 3	Médias aritméticas de contagem de ovos por grama de fezes no dia da aplicação do monepantel (D0) e após 14 dias (D14) em dez propriedades de uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP.....	24
Tabela 4	Manejo de vermifugação das dez propriedades (P) de uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP onde foi realizada pesquisa da eficácia do monepantel.....	35
Tabela 5	Histórico da utilização do anti-helmíntico monepantel em dez propriedades (P) localizadas em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP.....	36
Tabela 6	Percentuais de redução e de eficácia dos valores médios das contagens de ovos de nematódeos (Estrongilídeos) por grama de fezes (OPG) em ovinos dos grupos controle e tratado, nas datas pós-tratamento com monepantel.....	39
Tabela 7	Número médio de <i>Haemonchus contortus</i> recolhidos de ovinos pertencentes aos grupos controle e tratado com monnepantel; percentuais de eficácia.....	40

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representação da localização geográfica das dez propriedades criadoras de ovinos dentro do estado São Paulo-Brasil (A); Distribuição geográfica das dez propriedades em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP (B).....	13
Figura 2	Criações de ovinos em sistemas intensivo, semi-intensivo e confinado, com diferentes raças.....	15
Figura 3	Fluxograma ilustrando o delineamento experimental na fase de obtenção de larvas infectantes (L ₃) de uma linhagem resistente de <i>Haemonchus contortus</i> ao monepantel.....	19
Figura 4	Fluxograma do delineamento experimental dos testes de eficácia por meio de teste de redução de ovos e teste crítico, que ocorreram após infecção experimental com L3 de <i>H. contortus</i> resistente ao monepantel.....	21
Figura 5	Localizações das propriedades criadoras de ovinos e eficácia do monepantel. As cores diferentes representam a eficácia do vermífugo em cada propriedade, vermelho é ineficaz, azul é eficaz e verde é altamente eficaz.....	25
Figura 6	Gráficos representativos das contagens de OPG no dia 0 (dia do tratamento com monepantel) e no dia 14 com suas respectivas médias aritméticas abaixo. Resultados obtidos em duas propriedades (1 e 4) localizadas em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP onde monepantel foi ineficaz.....	26
Figura 7	Gráficos representativos das contagens de OPG no dia 0 (dia do tratamento com monepantel) e no dia 14 com suas respectivas médias aritméticas abaixo. Resultados obtidos em duas propriedades (9 e 10) localizadas em uma microrregião em torno	

	de Jaboticabal-SP onde monepantel foi eficaz.....	26
Figura 8	Gráficos representativos das contagens de OPG no dia 0 (dia do tratamento com monepantel) e no dia 14 com suas respectivas médias aritméticas abaixo. Resultados obtidos em seis propriedades (2, 3, 5, 6, 7 e 8) localizadas em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP onde monepantel foi altamente eficaz.....	27
Figura 9	Porcentagem de L ₃ de helmintos encontrados após coprocultura das fezes coletadas no dia 0 (D0) e no dia 14 (D14) nas propriedades 1 e 4 da microrregião em torno de Jaboticabal, onde o monepantel foi considerado ineficaz após teste de redução de ovos.....	28
Figura 10	Porcentagem de L ₃ de helmintos encontrados após coprocultura das fezes coletadas no dia 0 (D0) e no dia 14 (D14) nas propriedades 9 e 10 da microrregião em torno de Jaboticabal, onde o monepantel foi considerado eficaz após teste de redução de ovos.....	29
Figura 11	Gêneros de helmintos encontrados após coprocultura das fezes coletadas do dia 0 (D0) e no dia 14 (D14) nas propriedades 2 e 3 da microrregião em torno de Jaboticabal em que o monepantel foi considerado altamente eficaz após teste de redução de ovos.....	30
Figura 12	Gêneros de helmintos encontrados após coprocultura das fezes coletadas do dia 0 (D0) e no dia 14 (D14) nas propriedades 5 e 6 da microrregião em torno de Jaboticabal em que o monepantel foi considerado altamente eficaz após teste de redução de ovos.....	31
Figura 13	Gêneros de helmintos encontrados após coprocultura das fezes coletadas do dia 0 (D0) e no dia 14 (D14) nas propriedades 7 e 8 da microrregião em torno de Jaboticabal em que o monepantel foi considerado altamente eficaz após teste de redução de ovos.....	32

1 INTRODUÇÃO

A domesticação dos ovinos e o aproveitamento de sua carne e leite para alimentação; e sua lã e pele para proteção foram de grande vantagem para o homem (CHESSA et al., 2009). Hoje é uma espécie explorada economicamente em vários países, e o Brasil tem grande potencial para ovinocultura, especialmente de corte.

O crescimento do setor sofre influências regionais relacionadas a cultura, hábitos de consumo e enfrenta dificuldades de logística como a baixa disponibilidade de frigoríficos para abate e pouca homogeneidade dos animais fornecidos aos frigoríficos, e ainda problemas técnicos decorrentes do pouco conhecimento de técnicos e criadores sobre a criação de ovinos.

A ovinocultura no Brasil se iniciou junto com a colonização pelos portugueses, esses pequenos animais foram trazidos com principal interesse na produção de lã e carne para suprir a necessidade dos colonizadores (COSTA; SIMÕES; RIET-SORREA, 2011). Atualmente, de acordo com o IBGE (IBGE, 2012), o rebanho ovino brasileiro é composto por aproximadamente 17 milhões de animais. O estado do Rio Grande do Sul ocupa o primeiro lugar em número de cabeças seguido por alguns estados da região nordeste. O estado de São Paulo está classificado na nona posição dessa lista.

Como em todo sistema de produção e independente do tipo de criação, os ovinos sofrem com enfermidades, e o manejo sanitário precisa ser feito de forma adequada à espécie (LUX HOPPE; TESTI, 2012). Entretanto, existe a tendência de se criar ovinos com os conhecimentos que se sabe de criação de bovinos, a qual é um tipo de criação mais tradicional no Brasil.

A espécie ovina é bastante sensível às verminoses, em especial ao nematódeo *Haemonchus contortus*. Além de sua elevada patogenicidade, esses helmintos são capazes de completar seu ciclo biológico em espaços de tempo curtos, possibilitando a seleção de linhagens resistentes a medicamentos em curtos períodos de tempo (CAVALCANTE et al., 2009).

Uma vez que o tratamento anti-helmíntico normalmente se baseia na aplicação de anti-helmínticos, a ineficácia desses fármacos geram problemas que vão além de simples verminoses. Adicionalmente, o alto custo necessário para desenvolvimento de novas moléculas com ação anti-helmíntica acarreta em baixa disponibilidade de grupos químicos diferentes para o tratamento (PRICHARD, 1994).

A necessidade de vermifugações está relacionada, entre outros fatores, ao sistema de criação e o manejo sanitário, pois irão influenciar na carga parasitária dos animais. Sabe-se que quanto menor o intervalo entre as aplicações e anti-helmínticos, maior a pressão de seleção para resistência anti-helmíntica.

Além do problema com a resistência anti-helmíntica, os custos de produção podem se elevar de forma a reduzir os lucros ou até inviabilizar a criação. BARROS et al. (2009) fez um estudo econômico comparando diferentes sistemas de terminação de cordeiros observando que o gasto com anti-helmínticos foi o maior responsável pela diferença no custo de produção nos diferentes sistemas. O gasto maior observado foi na criação de animais terminados a pasto com gasto anual de R\$835,71, que foi maior do que em outros sistemas de terminação em confinamento.

Pensando em uma nova alternativa no controle de verminoses em ovinos, o monepantel, fármaco do grupo dos derivados da aminoacetona, é a primeira molécula comercial de um grupo químico inteiramente novo, representando uma alternativa ao tratamento de linhagens multiresistentes. Entretanto, após três anos de utilização começaram a aparecer casos de resistência a esse fármaco na Nova Zelândia (SCOTT et al., 2013), no Uruguai (MEDEROS; RAMOS; BANCHERO, 2014) e na Holanda (VAN DEN BROM et al., 2015).

Dessa forma, estudar a eficácia dos anti-helmínticos e tentar entender quais fatores podem estar associados ao aparecimento de resistência anti-helmíntica podem auxiliar positivamente para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes no controle das verminoses e assim aumentar a rentabilidade das criações de ovinos. Esses estudos ajudam a aumentar o período de utilização de novas moléculas, as quais são tão difíceis de serem desenvolvidas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anti-helmínticos

Um dos grandes entraves da ovinocultura brasileira e mundial são as verminoses gastrointestinais. Desta forma, os medicamentos anti-helmínticos são amplamente utilizados como principal ferramenta de controle de helmintos.

Dentre os nematóides gastrointestinais de ovinos, o *Haemonchus contortus* é a principal espécie, seguido pelo *Trichostrongylus colubriformis* e outros gêneros, como *Oesophagostomum*, *Cooperia*, *Strongyloides*, *Trichuris*, *Teladorsagia* e *Nematodirus*. A importância de cada gênero de nematóide varia de acordo com a região geográfica, clima, consorciação com outros animais, tipo de manejo, dentre outros fatores regionais (AMARANTE et al., 1992).

Historicamente, os primeiros anti-helmínticos utilizados foram derivados de substâncias naturais. Inicialmente, foi utilizado o sulfato de cobre em 1881 e o tetracloreto de carbono em 1926. Na década de 40 foram introduzidas a fenotiazina e a piperazina para o tratamento de nematódeos gastrointestinais. Em 1960 foram descobertos os anti-helmínticos de amplo espectro de atividade, maior eficácia e menor toxicidade (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2014).

A partir de então, anti-helmínticos de amplo espectro de três grupos farmacológicos com diferentes mecanismos de ação tem sido utilizados por anos, sendo eles os benzimidazóis, imidazotiazóis e lactonas macrocíclicas (MARTIN, 1997). Recentemente, um novo medicamento com diferente mecanismo de ação foi desenvolvido, o monepantel, primeiro representante do grupo dos derivados de amino acetonitrila (KAMINSKY et al., 2008a).

Os anti-helmínticos atuam por meio de mecanismos de ação distintos, mas de forma geral, estão agrupados em duas categorias: aqueles que agem mais rapidamente nos canais iônicos de membrana celular e aqueles que agem mais lentamente nos processos celulares bioquímicos (LECOVÁ et al., 2014). De qualquer forma, podem interferir na produção de energia, na coordenação

neuromuscular e na dinâmica microtubular causando eliminação dos parasitos devido a inanição ou expulsão por paralisia (SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2014).

Os anti-helmínticos do grupo dos benzimidazóis surgiram com o desenvolvimento do tiabendazol em 1961, o que marcou o início da era moderna dos anti-helmínticos de amplo espectro. Eles eram bastante vantajosos em relação aos primeiros existentes, pois eram mais seguros, eficazes contra uma ampla variedade de helmintos nematoides e podiam ser administrados em esquemas versáteis (ADAMS, 2003).

Os anti-helmínticos deste grupo possuem afinidade à uma proteína estrutural dos helmintos, a tubulina, se ligando a ela de forma a interferir no padrão de sua despolimerização para formação dos microtúbulos (SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2014). Mais especificamente, eles se ligam à β -tubulina, a qual, por sua vez, evita sua dimerização com a α -tubulina e a polimerização dos oligômeros da tubulina dentro dos microtúbulos (ADAMS, 2003).

Desta forma, interrompe processos vitais para função celular, já que os microtúbulos são unidades estruturais essenciais de muitas organelas e são necessários para inúmeros processos celulares. Conseqüentemente, provocam déficit energético por destruição das células intestinais e inibição da produção de ovos (ADAMS, 2003; SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2014).

Os imidazotiazóis foram comercializados a partir de 1965, e o tetramisole foi o primeiro princípio ativo deste grupo químico. Compõem este grupo o tetramisole e o levamisole, os quais penetram no parasita através da cutícula, atuando nos receptores nicotínicos sinápticos e extrassinápticos das membranas das células musculares dos helmintos. Esse processo induz a abertura dos canais iônicos, o que aumenta a condução de sódio e provoca a despolarização da membrana. Desta forma, são considerados agonistas colinérgicos, e provocam contração muscular e paralisia espástica dos parasitas, que são posteriormente eliminados do hospedeiro (MARTIN, 1997; SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2014).

As lactonas macrocíclicas constituem a mais importante família de anti-helmínticos devido a sua grande utilização. São bastante aceitas no mercado por razões econômicas e devido a alta eficácia, amplo espectro de ação e baixa

toxicidade; além disso, é o único grupo de anti-helmínticos que pode ter ação endectocida (MCCAVERA; WALSH; WOLSTENHOLME, 2007; PRICHARD; ROULET, 2007).

Estes medicamentos penetram nos parasitos supostamente por absorção transcuticular ou ainda, por via oral, nos helmintos hematófagos (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2014). Vão agir provocando paralisia seletiva dos parasitas, pelo aumento da permeabilidade de íons cloro (Cl⁻) no músculo, potencializando os canais iônicos mediados pelo glutamato (GluCl). Em baixas concentrações, potencializa o efeito do glutamato, e em altas concentrações, abrem os canais mediados diretamente pelo glutamato (MARTIN, 1997)

O grupo de anti-helmínticos derivados de aminoacetonitrila, surgiu recentemente como uma solução para rebanhos que apresentavam multi-resistência, o que representa um problema global crescente. Representante deste grupo, o monepantel foi introduzido no mercado primeiro na Nova Zelândia, em 2009 (HOSKING et al., 2010) e depois no Brasil em 2012. Detalhes do seu modo de ação, farmacocinética e farmacodinâmica serão revisados separadamente.

2.2 Farmacocinética e farmacodinâmica do monepantel

Os primeiros estudos para entender o mecanismo de ação deste grupo de anti-helmínticos foram realizados em *Caenorhabditis elegans*, os quais determinaram o gene *acr-23* como o principal alvo nesta espécie de helminto nematoide (KAMINSKY et al., 2008b). Já em isolados de *Haemonchus contortus*, foi relatado o gene monepantel-1 (*Hco-mptl-1*) como maior candidato para ação desse fármaco (KAMINSKY et al, 2008b; RUFENER et al., 2009).

O monepantel atua no receptor nicotínico nAChR, que é encontrado apenas em nematódeos. Mais especificamente, atuam nas subunidades Cel-*acr-23* (ou *ACR-23*) e *Hco-mptl-1* (*MPTL-1*), que são membros da subfamília DEG-3 de genes das subunidades do receptor de acetilcolina. Este grupo de medicamentos atua, portanto, como agonista dos canais iônicos, o que causa hipercontração e consequente paralisia espástica do nematódeo (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2014). Após estudo com algumas espécies de nematoides pesquisando outras

subunidades dos receptores nicotínicos, Rufener et al. (2010) sugeriram que, além do MPTL-1, que é o alvo primário do monepantel, o DES-2 pode ser um alvo secundário.

Certas subunidades da superfamília de ligantes de canais iônicos proporcionam alvos específicos de drogas anti-hemínticas. Os imidazotiazóis também agem como agonistas de nAChR. Entretanto, em subunidades distintas do monepantel (RUFENER et al., 2010).

Foi verificado que o monepantel possui baixa toxicidade e boa tolerabilidade para ruminantes e roedores, com uma meia vida terminal de 215 horas (KAMINSKY et al., 2008b). O fabricante do medicamento (Novartis Saúde Animal) recomenda carência de 7 dias para abate e não recomenda a utilização em animais produtores de leite para consumo humano.

2.3 Resistência anti-helmíntica

Cavalcante et al. (2009) definiram resistência parasitária como o fenômeno que impede um fármaco de manter a mesma eficácia contra os parasitas, se utilizada nas mesmas condições e após um determinado período de tempo. Já Coles et al. (1992) sugeriram que ela está presente quando a eficácia da dose terapêutica normal está abaixo de 95%.

Coles et al. (2006) revisaram vários métodos que podem ser utilizados para detecção de resistência anti-helmíntica, tais como: teste de redução na contagem de ovos, teste de eclodibilidade de ovos, teste de desenvolvimento larval, testes moleculares, testes de eficácia controlados e testes *in vitro*. Estes tem sido utilizados e demonstrando que atualmente, vários países apresentam problemas com baixa eficácia de anti-helmínticos. Em algumas situações, isto acontece aos três grupos químicos disponíveis, a exemplo do ocorrido na África do Sul (VAN WYK; MALAN; RANGLES, 1997).

A resistência parasitária tem causado grande impacto na produção de ovinos, em países como a África do Sul, Austrália e Nova Zelândia. Vários produtores tradicionais estão desativando seus criatórios devido à escassez de alternativas para

o combate das infecções parasitárias e a baixa produtividade dos rebanhos (VAN WYK MALAN; RANGLES, 1997). Este fato tem ocorrido também em criações aqui na América do Sul (RAMOS et al., 2002; MEJIA et al., 2003; SCZESNY-MORAES; BIANCHIN; SILVA, 2010).

Relatos de problemas com resistência anti-helmíntica primeiramente apareceram logo após a introdução do tiabendazole em 1964. Ainda, casos documentados de resistência envolvendo compostos benzimidazólicos proliferaram nos anos 70 (PRICHARD, 1994).

Este problema disseminou-se pelo mundo inteiro, com vários relatos de resistência aos principais princípios ativos utilizados. Gopal, Pomroy e West (1999) fizeram o primeiro relato de resistência à ivermectina em um isolado de *T. colubriformis* na Nova Zelândia.

A resistência anti-helmíntica múltipla em caprinos foi detectada por Miller e Craig (1996) nos Estados Unidos, em um isolado de *H. contortus* resistente a ivermectina, alcançando um percentual de eficácia de -179%, 1% e 23% para a ivermectina, fenbendazol e levamisol, respectivamente. Estes mesmos autores citaram o primeiro relato de desenvolvimento de resistência natural de *Haemonchus contortus* à ivermectina nos Estados Unidos, no ano de 1990.

Sczesny-Moraes, Bianchin e Silva (2010) relataram que os primeiros registros de resistência a anti-helmínticos no Brasil surgiram nos anos 60, ocorrendo em primeiro lugar, no Rio Grande do Sul, em 1967, com resistência de *Haemonchus contortus* ao tiabendazole. Amarante et al. (1992) constataram resistência múltipla ao oxfendazol, levamisol e ivermectina na maioria das propriedades estudadas no Estado de São Paulo, sendo *Trichostrongylus* resistente ao levamisol e *Haemonchus* aos três anti-helmínticos testados (oxfendazol, ivermectina e levamisol).

Echevarria et al. (1996) observaram resistência antihelmíntica em 97% das 182 propriedades avaliadas no Rio Grande do Sul, sendo que 90% apresentaram resistência ao albendazole, 84% ao levamisole e 73% a combinação de albendazole e levamisole.

Ramos et al. (2002) avaliaram 65 rebanhos ovinos em Santa Catarina observando que a multi-resistência estava presente na maioria dos rebanhos. Nos rebanhos analisados 77% apresentavam *Haemonchus* spp resistentes a

ivermectina, 74% *Haemonchus* spp resistentes ao albendazole e 13% *Haemonchus* spp resistentes ao closantel. Em 15% dos rebanhos foi observada resistência ao levamisol, e neste caso, a resistência ocorreu com *Trichostrongylus* spp (44%) e *Ostertagia* spp (39%).

Sczesny-Moraes, Bianchin e Silva (2010) ao avaliar os gêneros de nematóides presentes na coprocultura pré e pós tratamento com diferentes anti-helmínticos no estado do Mato Grosso do Sul, observaram que 80% de *Haemonchus contortus* presentes pré-tratamento estavam presentes após o tratamento, demonstrando quadro de resistência parasitária.

De forma geral, quanto mais se controla os vermes com drogas, mais facilmente a resistência se desenvolve. Isto porque o tratamento com drogas leva ao aparecimento de vermes resistentes, pois quando conseguem se reproduzir, contribuem com genes resistentes para a próxima geração (SANGSTER, 1999).

Algumas práticas de manejo podem minimizar estes efeitos, sendo recomendados esquemas estratégicos e seletivos para tratamento e, desta forma, mantendo-se uma maior quantidade de larvas de helmintos em refugia. Isto quer dizer que, fazendo a vermifugação dos animais baseada em informações do ciclo biológico dos helmintos da região e das condições climáticas (tratamento estratégico) ou ainda, de forma seletiva baseada na necessidade do tratamento, por avaliações de coloração da mucosa ocular (método Famacha), avaliação da carga parasitária por exames de fezes ou avaliação do ganho de peso, parte dos helmintos não entrarão em contato com o vermífugo (COSTA; SIMÕES, RIET-CORREA, 2011).

Assim, o termo *refugia* é utilizado para definir um grupo de larvas que permanece na pastagem sem sofrer ação das drogas, sendo consideradas como um estoque de larvas susceptíveis. Um fator importante para minimizar o fenômeno da resistência anti-helmíntica são as larvas em refugia, pois o aparecimento da resistência anti-helmíntica está intimamente ligado ao sucesso da progênie que sobreviveu ao tratamento (VAN WYK, 2001).

O controle de helmintos de forma supressiva pode aumentar a pressão de seleção para resistência. Echevarria et al. (1996) relataram que propriedades em que os cordeiros recebiam menos que três tratamentos/ano observou-se 6,7% de

resistência; com 4 a 6 tratamentos observou-se 44,9% e com mais de 7 tratamentos/ano observou-se 48,3% de resistência. Os principais nematódeos que se mostraram resistentes foram *Ostertagia*, *Haemonchus* e *Trichostrongylus*.

Geralmente, suspeita-se de resistência anti-helmíntica quando se obtém baixa resposta após o tratamento anti-helmíntico. Por outro lado, a falha na resposta ao medicamento não significa, necessariamente, resistência anti-helmíntica, pois alguns sinais clínicos não são específicos e podem ser devido a outras doenças ou a nutrição deficiente (VIEIRA, 2008).

Algumas práticas podem favorecer o aparecimento da resistência parasitária. Estão entre os fatores predisponentes: tratar o rebanho em intervalos curtos, especialmente quando estes são inferiores ao período pré-patente dos helmintos; alternar diferentes famílias de medicamentos em intervalos inferiores a um ano; utilizar produtos de ação prolongada com grande frequência no ano, ou seja, acima de três vezes; adquirir animais contaminados com parasitas resistentes; tratar o rebanho todo, chamado tratamento massal, impedindo a sobrevivência de parasitas em refúgio (CAVALCANTE et al., 2009; COSTA ; SIMÕES; RIET-CORREA, 2011)

2.4 Resistência anti-helmíntica ao monepantel

O monepantel foi desenvolvido em 2008 na Nova Zelândia sendo inicialmente comercializado no mesmo país em 2009 e desde então mostrou-se totalmente efetivo contra nematoides multi-resistentes (HOSKING et al., 2010; KAMINSKY et al., 2011; GEORGE et al., 2012 e SAGER et al., 2012).

Scott et al. (2013) avaliaram a eficácia do monepantel em caprinos e ovinos por meio do teste de redução de ovos, observando 0% de eficácia. Realizaram também um teste de eficácia controlado em ovinos com o objetivo de confirmar os resultados obtidos anteriormente, e a falha na eficiência foi confirmada em ovinos abatidos, especialmente em relação a *Teladorsagia circumcincta* (0,0%) e *Trichostrongylus colubriformis* (9,0%). De forma curiosa, a eficácia contra o *Oesophagostomum venulosum* ficou também abaixo do esperado, com 48%. Ainda, foi demonstrada nenhuma eficácia contra *Capillaria spp*, *Trichuris spp* e

Strongyloides spp, entretanto, até então não foi registrada atividade do monepantel contra estes parasitas.

Um segundo relato de resistência ao monepantel foi descrito por Mederos, Ramos e Banchemo (2014) no Uruguai, que realizaram o teste de redução de ovos para investigar a suspeita de ineficiência do vermífugo em duas criações de ovinos, que foi comprovada. Neste caso, o principal helminto envolvido, na avaliação da coprocultura antes e após o tratamento foi o *Haemonchus spp*.

O terceiro e mais recente relato de resistência ao monepantel ocorreu na Holanda (VAN DEN BROM et al., 2015) em uma criação de ovinos. Neste país o monepantel foi introduzido em 2011 e em 2014 esta propriedade já estava tendo problemas com cordeiros doentes e mortalidade de 131 animais após 10 dias do tratamento. Após teste de redução de ovos nas fezes foi observada eficácia de 0% com coprocultura pré e pós-tratamento, apresentando 100% de larvas de *Haemonchus*.

Da mesma forma que foi relatado nos dois estudos anteriores, na propriedade do estudo em questão (VAN DEN BROM et al., 2015), o monepantel foi utilizado como único vermífugo por dois anos. Assim, sabe-se que a resistência ao monepantel se desenvolve em um número limitado de ciclos de gerações, diferente do que aconteceu com os medicamentos dos outros grupos de anti-helmínticos.

Os mecanismos de resistência anti-helmíntica parecem não ser fáceis de serem identificados. É difícil estabelecer uma comparação de populações resistentes e suscetíveis de helmintos em nível molecular e genético e, desta forma, estabelecer um critério para relacionar um alelo ou um polimorfismo a resistência anti-helmíntica. Entretanto, já foram evidenciadas mutações nos genes que compõem os receptores para ivermectina em populações de nematoides resistentes, assim como polimorfismo da β -tubulina associado a resistência do *Haemonchus contortus* aos benzimidazóis (MCCAVERA; WALSH; WOLSTENHOLME, 2007).

Nos três trabalhos que pesquisaram e confirmaram resistência anti-helmíntica do monepantel em helmintos parasitas de animais a campo (SCOTT et al., 2013; MEDEROS; RAMOS; BANCHERO, 2014; VAN DEN BROM et al., 2015) não foram realizados estudos moleculares para melhor entendimento do mecanismo de resistência.

A resistência ao monepantel foi registrada em condições experimentais em *Caenorhabditis elegans* e *Haemonchus contortus* antes da sua introdução em 2009. Foi induzida a resistência com subdosagens do medicamento e o mecanismo de ação proposto estava relacionado aos genes que mostraram mutações, os quais são das subunidades do receptor nAChR já mencionados anteriormente. Assim, foi sugerido que mesmo que este medicamento tenha demonstrado ser altamente efetivo, seria importante utilizá-lo de forma consciente associada a outras medidas de controle para evitar o aparecimento da resistência (KAMINSKY et al., 2008b).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o perfil de resistência ao monepantel em criações de ovinos próximas a Jaboticabal-SP.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a eficácia do monepantel em propriedades ovinocultoras em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP, pelo teste de redução de ovos nas fezes e avaliar possíveis fatores de risco associados à resistência.

Avaliar a eficácia do monepantel em uma linhagem de *Haemonchus contortus* em propriedade criadora de ovinos com suspeita de baixa eficácia por meio do teste crítico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Situação de resistência do anti-helmíntico monepantel em criações de ovinos em uma microrregião em torno de Jaboticabal/SP

Foram visitadas dez propriedades de criação de ovinos no estado de São Paulo em uma microrregião em torno de Jaboticabal, cujos pontos de localização geográfica foram registrados com auxílio de aparelho de GPS (Sistema de Posicionamento Global) e demonstrados em mapa geográfico de pontos (Figura 1) utilizando o software MapInfo® Professional versão 7.5. A caracterização da criação e a geoposição destas dez propriedades estão descritas na Tabela 1.

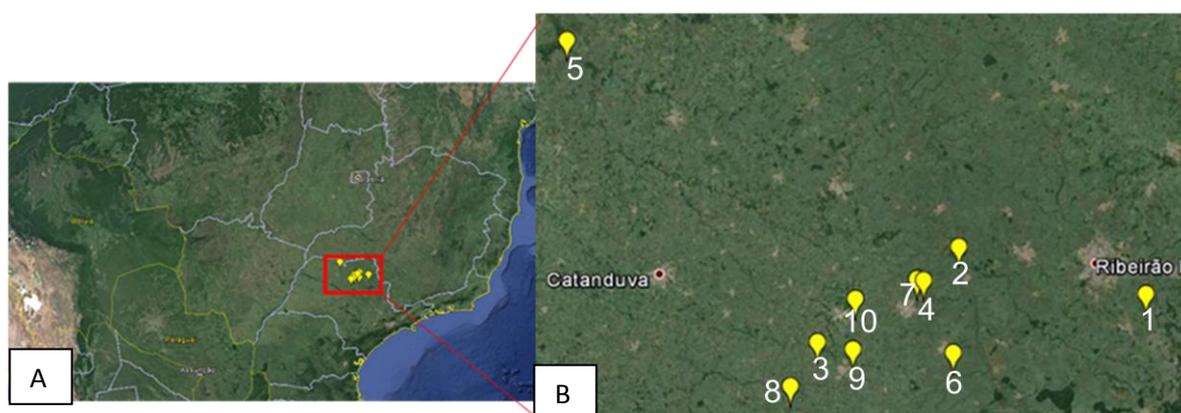


FIGURA 1. Representação da localização geográfica das dez propriedades criadoras de ovinos dentro do estado São Paulo-Brasil (A); Distribuição geográfica das dez propriedades em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP (B). Os números 2, 4 e 7 representam as propriedades que estão no município de Jaboticabal.

TABELA 1. Localizações e caracterização dos sistemas de criação e raças criadas em dez propriedades ovinocultoras na microrregião em torno de Jaboticabal que foram utilizadas no estudo da situação de resistência do monepantel.

Propriedade	Município	Geoposição	Sistema de criação	Raças criadas
1	Cravinhos	S 21°18'36.8" W 47°41'20.3"	Extensivo	Dorper, Poll Dorset, Texel
2	Jaboticabal	S 21°09'47.8" W 48°10'37.8"	Extensivo	Santa Inês
3	Taquaritinga	S 21° 23'42" W 48°34'13.7"	Extensivo	Santa Inês, Dorper
4	Jaboticabal	S 21° 14'21.61" W 48° 17'39.67"	Semi-intensivo	Poll Dorset
5	Onda Verde	S 20°34'29.1" W 49°11'17.7"	Misto	Santa Inês
6	Guariba	S 21°25'56.64" W 48°12'33.89"	Misto	Santa Inês, Dorper
7	Jaboticabal	S 21°14'36.1" W 48°16'36.0"	Intensivo	Santa Inês
8	Taquaritinga	S 21°29'34.0" W 48°39'00.6"	Extensivo	Santa Inês, Dorper
9	Taquaritinga	S 21°24'30.7" W 48°28'37.0"	Semi-intensivo	Texel, Dorper, White Dorper, Santa Inês
10	Monte Alto	S 21°16'48.95" W 48°27'42.65"	Intensivo	Santa Inês, Texel

Algumas propriedades eram mais tecnificadas e criavam diferentes raças e outras menos tecnificadas, e ainda tendo variações no regime de criação, com criações intensivas, semi-intensivas e confinadas (Figura 2). Na propriedade 1 os animais eram criados em sistema extensivo, porém, com alta tecnificação.



FIGURA 2. Criações de ovinos em sistemas intensivo, semi-intensivo e confinado, com diferentes raças. A - Ovinos da raça Santa Inês em sistema intensivo da propriedade 7; B – Ovinos da raça Poll Dorset em sistema de criação semi-intensivo da propriedade 4 ; C – Ovinos da raça Texel em sistema semi-intensivo da propriedade 9; D- Ovinos de cruzamento Santa Inês x Dorper em sistema extensivo da propriedade 8.

Um levantamento do histórico da utilização do monepantel, foi realizado, assim como, do calendário de vermifugação em cada propriedade visitada, afim de levantar fatores de risco associados a eficácia do monepantel. O roteiro de informações a serem coletadas está no ANEXO 1.

Coletas de fezes, da maioria dos animais das propriedades, foram realizadas. Com a mão enluvada, eram coletadas fezes diretamente do reto, não sendo permitido o contato com o solo, evitando assim possível contaminação. Foram acondicionadas em sacos plásticos identificados individualmente e mantidas refrigeradas em caixa isotérmica até chegada ao laboratório do departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Chegando ao laboratório, as amostras ficaram armazenadas em refrigerador (2 a 8° C) até o momento do processamento, que ocorreu no máximo 48 horas após a coleta.

Foi realizado o exame de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de acordo com a técnica de Gordon e Whitlock modificado por Ueno e Gonçalves (1998). Utilizou-se 2 gramas de fezes maceradas de cada animal as quais foram homogeneizadas em 58 mL de solução salina saturada e coadas. Posteriormente, colocadas na câmara de MacMaster para contagem e determinação da quantidade de ovos por grama de fezes (OPG) por animal.

Os ovinos que apresentaram contagem de OPG ≥ 1000 foram utilizados para o teste de redução de ovos. As amostras não foram colhidas ao acaso, pois se procurou selecionar animais que tinham maior probabilidade de estar com altas contagens de OPG, dando preferência para aqueles com sinais clínicos de verminose ou para as categorias mais predisponentes.

Desta forma, o número de animais utilizados por propriedade foi variável, mas, era necessário pelo menos 8 animais com OPG ≥ 1000 para a propriedade ser selecionada para o estudo. Não foi possível fazer grupos separados para diferentes faixas etárias, pois não havia pelo menos 8 animais de cada faixa etária nas propriedades. A Tabela 2 detalha o número de animais selecionados com OPG ≥ 1000 .

TABELA 2. Caracterização do tamanho das criações de ovinos da microrregião ao redor de Jaboticabal-SP. Descrição do número de animais utilizados no teste de redução de ovos (OPG ≥ 1000) cuja amostragem foi realizada selecionando os animais das propriedades com maior probabilidade de estar com alta contagem de ovos por grama de fezes.

Propriedade	Tamanho da criação (cabeças)	Número de animais utilizados no teste de redução de ovos (OPG≥ 1000)
1	1000	16
2	350	27
3	40	20
4	30	13
5	257	08
6	70	23
7	70	10
8	50	16
9	200	19
10	200	17

Para o teste de redução de ovos, os animais selecionados receberam tratamento com monepantel¹ na dosagem de 1mL/10Kg de peso vivo, por via oral, no dia considerado dia zero (D0). Quatorze dias pós-tratamento (D14), foi repetida a coleta de fezes para determinação da eficácia do monepantel baseada nos valores das contagens de ovos obtidas no D0 e no D14.

Coproculturas das fezes foram realizadas também no dia do tratamento com monepantel (D0) e quatorze dias após (D14) segundo a técnica de Roberts e O'Sullivan (UENO; GONÇALVES, 1998). As fezes foram maceradas e misturadas em maravalha autoclavada e, posteriormente, mantidas em recipientes por sete dias garantindo condições de temperatura e umidade para desenvolvimento de larvas infectantes.

As larvas infectantes foram extraídas e então, identificadas de acordo com critérios estabelecidos por Ueno e Gonçalves (1998) e Van Wyk, Cabaret e Michael (2004).

4.2 Testes da eficácia do monepantel em ovinos experimentalmente infectados com um isolado de *Haemonchus contortus*

Uma das dez propriedades selecionadas para o estudo da “Situação de resistência do anti-helmíntico monepantel em propriedades de ovinos na região de Jaboticabal/SP”, foi escolhida para esta segunda etapa do trabalho.

Foram selecionados seis ovinos da propriedade 1, localizada no município de Cravinhos, com suspeita de baixa eficácia do monepantel. Estes animais apresentavam contagens de OPG \geq 2500, após a quantificação da carga parasitária pelo método de Gordon e Whitlock modificado por Ueno e Gonçalves (1998), conforme descrito anteriormente.

Os animais receberam tratamento anti-helmíntico composto de monepantel, na dosagem de 1mL/10Kg de peso vivo por via oral o que corresponde a 2,5mg/Kg de peso vivo. No D14 foram realizadas coproculturas das fezes segundo a técnica de Roberts e O'Sullivan (UENO; GONÇALVES, 1998), para obtenção de larvas infectantes L₃ que foram identificadas segundo critérios estabelecidos por Ueno e Gonçalves (1998) e Van Wyk, Cabaret e Michael (2004).

¹ Zolvix[®] – Novartis Saúde Animal

A linhagem supracitada foi inoculada em dois ovinos doadores, oriundos de uma propriedade distinta, por via oral para produção de inóculos puros de L₃ de *H. contortus* (linhagem resistente). Estes animais doadores eram carneiros jovens, com idade inferior a um ano, de raças mestiças. Monitoramento por análises parasitológicas (OPG) e tratamento com os anti-helmínticos moxidectina, monepantel, e triclorfon foram realizados anteriormente para garantir que estavam livres de parasitas no momento da infecção experimental.

Os ovinos foram mantidos no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal em baias suspensas, pra evitar possíveis reinfecções. Receberam neste período alimentação composta por silagem de milho adicionado de ração comercial para cordeiros, além de água potável oferecida *ad libitum*.

Após infecção experimental, respeitou-se um período de patência de 32 dias. As fêmeas de *H. contortus* então foram obtidas do abomaso destes ovinos doadores, que foram eutanasiados, conforme as recomendações éticas descritas no Guia Brasileiro de Boas Práticas Para Eutanásia em Animais (CFMV, 2013). Na sequência, o trato gastrointestinal dos ovinos foi separado por seus segmentos anatômicos (abomaso, intestino delgado e intestino grosso), os abomasos isolados e separados por ligaduras duplas com fio de algodão.

Em seguida, cada abomaso foi aberto com auxílio de um enterótomo e toda a mucosa lavada em água corrente para colheita do conteúdo total e dos parasitas presentes. Os conteúdos totais de cada segmento foram submetidos a uma segunda lavagem e tamisados em tamis (Tyler 48, abertura 0,297mm) para concentração das amostras (WOOD et al., 1995, VERCRUYSSSE et al, 2001). As fêmeas de *H. contortus* foram selecionadas de acordo com critérios taxonômicos descritos por Levine (1968), Costa (2013) e Ueno e Gonçalves (1998).

Então, elas foram colocadas em placas de Petri com PBS e mantidas em estufa B.O.D. a 37°C, com iluminação desativada, para oviposição. Ao final do processo, os ovos obtidos foram cultivados em vermiculita por cerca de 10 dias, tempo suficiente para evoluírem ao terceiro estágio, obtendo-se as L₃ de *Haemonchus contortus* resistente ao monepantel.

O fluxograma ilustrando a fase de obtenção de larvas infectantes (L_3) da linhagem resistente de *Haemonchus contortus* ao monepantel está na Figura 3.

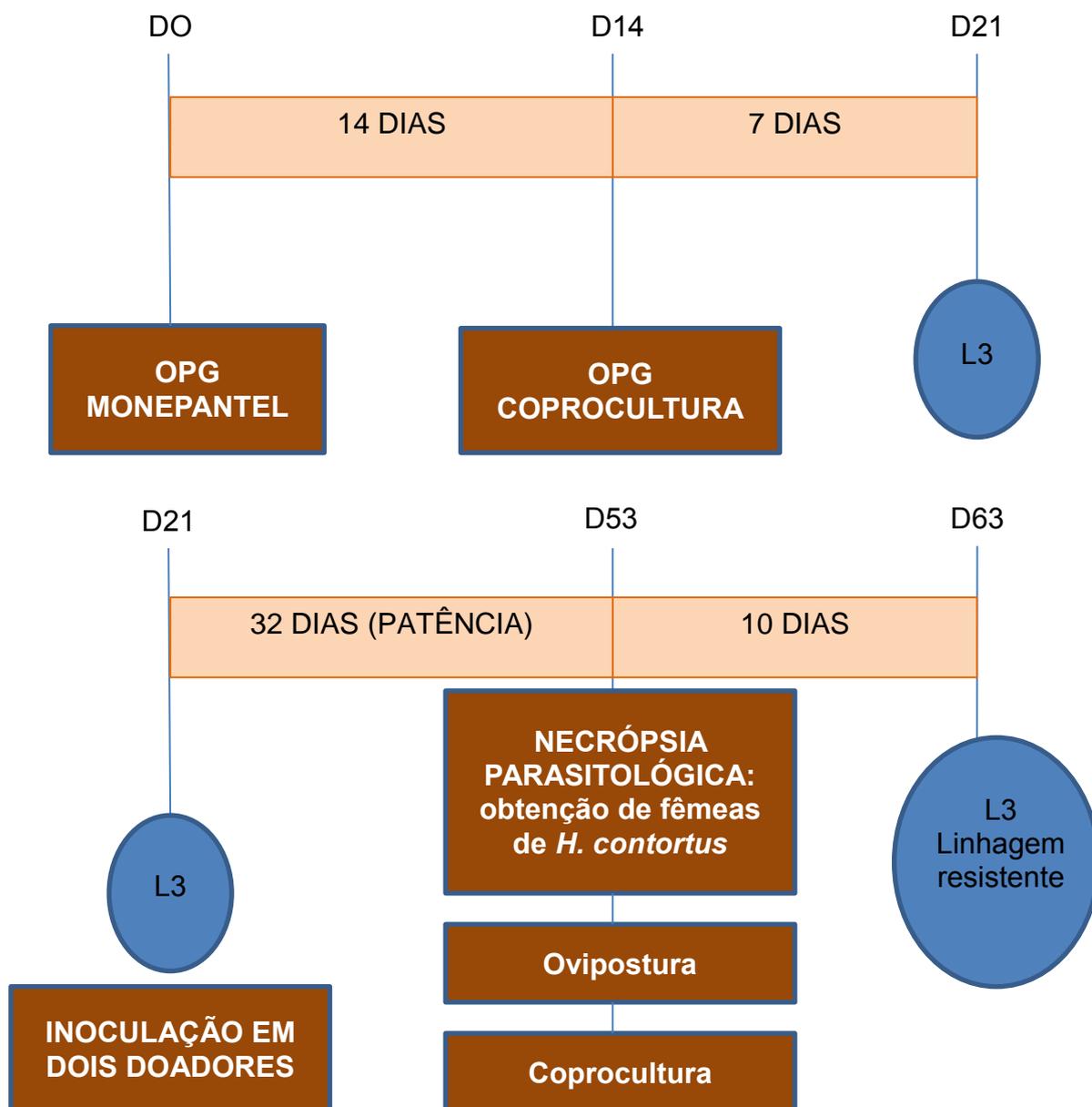


FIGURA 3. Fluxograma ilustrando o delineamento experimental na fase de obtenção de larvas infectantes (L_3) de uma linhagem resistente de *Haemonchus contortus* ao monepantel, que se iniciou no dia 0 (D0) e a obtenção ocorreu após 63 dias (D63)

Esta linhagem de *H. contortus* obtida foi inoculada por via oral em dez ovinos jovens, com idade inferior a um ano, de raças mestiças com contagens negativas de OPG. Receberam 5000 larvas infectantes (L_3) de *Haemonchus contortus*, e foram

então mantidos no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, durante todo período experimental, em baias individuais suspensas, impossibilitando possíveis reinfecções. Neste período, tiveram alimentação composta por silagem de milho adicionado de ração comercial para cordeiros, além de água potável oferecida *ad libitum*.

Após a infecção experimental, os animais foram monitorados até determinação da patência, que foi de 32 dias. Os ovinos foram então alocados nos grupos experimentais levando-se em conta as médias de OPG do dia -1 (um dia antes do tratamento com monepantel), como critério para sua distribuição aos pares em cinco baias suspensas, de forma que as médias de OPG dos grupos foram estatisticamente iguais.

Dentro de cada baia, os animais foram aleatoriamente alocados de forma que ficasse um animal do grupo controle e um animal do grupo tratado em cada uma de cinco baias. Após esse sorteio, cinco animais foram tratados na data experimental zero (D0), pela via oral, com monepantel na dose 2,5 mg/Kg, no volume de 1 mL/10 Kg de peso corporal e outros cinco animais mantidos como controle, que receberam a mesma dosagem de água destilada..

Foram colhidas fezes dos ovinos, infectados experimentalmente, diretamente do reto, não sendo permitido o contato com o solo, evitando assim possível contaminação. As amostras foram identificadas com o número do animal e data de colheita. As fezes colhidas permaneceram refrigeradas (2-8°C) até o momento das contagens de OPG (ovos por grama de fezes), que ocorreu até 48 horas pós-colheita.

As contagens de OPG foram realizadas, nos dez ovinos, nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14, para monitoramento, sendo considerando o dia 0 (D0), o dia do tratamento com monepantel,. Estas análises foram realizadas de acordo com a técnica de Gordon e Whitlock modificado por Ueno e Gonçalves (1998). Foram utilizados os dados do dia 0 e 14 para teste de redução da contagem de ovos e determinação da taxa de eficácia do monepantel.

Os ovinos dos dois grupos experimentais foram necropsiados no D14. Após jejum de 24 horas, foram eutanasiados conforme as recomendações éticas descritas

no Guia Brasileiro de Boas Práticas Para Eutanásia em Animais (CFMV, 2013). Na sequência, o trato gastrointestinal dos ovinos foi separado por seus segmentos anatômicos (abomaso, intestino delgado e intestino grosso), os abomasos isolados e separados por ligaduras duplas com fio de algodão. Em seguida, cada abomaso foi aberto com auxílio de um enterótomo e toda a mucosa lavada em água corrente para colheita do conteúdo total e dos parasitos presentes.

Os conteúdos totais de cada segmento foram submetidos a uma segunda lavagem e tamisados em tamis (Tyler 48, abertura 0,297mm) para concentração das amostras, além de armazenagem em potes plásticos acrescidos de formol a 10% pré-aquecido a 70°C (WOOD et al., 1995, VERCRUYSSSE et al, 2001).

A carga parasitária total dos conteúdos abomasais foi coletada utilizando-se estereomicroscópio e suas identificações específicas realizadas por meio da avaliação morfológica do nematódeo de acordo com os critérios taxonômicos descritos por Levine (1968), Costa (2013) e Ueno e Gonçalves (1998).

O delineamento experimental desta etapa do trabalho está ilustrado na Figura 4.



FIGURA 4. Fluxograma do delineamento experimental das avaliações de eficácia por meio de teste de redução de ovos e teste crítico, que ocorreram após infecção experimental com L₃ de *H. contortus* resistente ao monepantel. No dia menos um (D₋₁) foi realizado OPG (ovos por grama de fezes) para divisão dos dois grupos experimentais (tratamento com monepantel e controle). No D₀, os animais do grupo tratado receberam monepantel. Foi realizado monitoramento com OPG nos quatorze dias posteriores ao tratamento. Utilizaram-se os dados de OPG do D₀ e do D₁₄ para determinar a taxa de redução e taxa de eficácia do teste de redução de ovos e os dados da necropsia parasitológica do D₁₄ para eficácia do teste crítico.

4.3 Análise dos dados

A análise dos resultados do teste de redução de ovos realizado em animais infectados naturalmente, foi feita a partir dos resultados das contagens de OPG inicial (D0) e OPG final (D14). Para realizar este cálculo, foram consideradas as contagens de OPG de cada grupo no dia zero (OPG inicial), ou seja, cada grupo experimental, antes de receber o tratamento, desempenhou a função de controle (COLES et al., 1992), como mostra a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de Redução} = \frac{\text{Média de OPG no D0} - \text{Média de OPG no D14}}{\text{Média de OPG no D0}} \times 100$$

Em animais infectados experimentalmente com linhagem resistente de *H. contortus*, a taxa de redução de ovos foi obtida conforme descrita anteriormente e a taxa de eficácia foi determinada de acordo Wood et al. (1995), utilizando a fórmula a seguir:

$$\% \text{ de Eficácia} = \frac{\text{Média de OPG do grupo controle} - \text{Média de OPG do grupo tratado}}{\text{Média de OPG do grupo controle}} \times 100$$

As médias aritméticas foram utilizadas para estimar a percentagem de redução de helmintos, para cada grupo, pela fórmula preconizada pelo MAPA (1997) e Vercruysse et al. (2001), descrita abaixo. Para determinação de populações resistentes, utilizou-se a média aritmética, conforme preconizam estudos (DOBSON et al., 2009, VERCRUYSSSE et al., 2002).

$$\% \text{ de Eficácia} = \frac{\text{Média do n}^\circ \text{ de helmintos do grupo controle} - \text{Média do n}^\circ \text{ de helmintos do grupo tratado}}{\text{Média do n}^\circ \text{ de helmintos do grupo controle}} \times 100$$

As médias de contagens de ovos foram log-transformadas [$\log(x+1)$] devido a grande variabilidade numérica dos dados. Estes dados, e também, a contagem total de adultos, foram comparadas por teste t simples ou Mann-Whitney, em dependência do padrão de distribuição dos valores. Todos os resultados foram descritos na forma de média aritmética \pm desvio padrão, considerando nível de significância $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Situação de resistência do anti-helmíntico monepantel em propriedades de ovinos em uma microrregião em torno de Jaboticabal/SP

As médias aritméticas de contagem de ovos por grama de fezes no dia da aplicação do monepantel (D0) e após 14 dias (D14) estão apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3. Médias aritméticas de contagem de ovos por grama de fezes no dia da aplicação do monepantel (D0) e após 14 dias (D14) em dez propriedades de uma microrregião em torno de Jaboticabal.

Propriedade	OPG		p*	U**
	D0	D14		
1	13225±15837 ^a	2787,5±5210,1 ^b	0,0016	44,0
2	9714,81±113634	0		
3	15080±14150	0		
4	24846,2±30303 ^a	13046,1±12182 ^a	0,4417	69,0
5	3275±2782	0		
6	3026,1±3816	0		
7	3160±3097	0		
8	4168,7±3397 ^a	6,2±25 ^b	<0,0001	0,0
9	10936±20774 ^a	836,8421± 970,2 ^b	<0,0001	26,0
10	6511,8±6852 ^a	523,5±599,5 ^b	<0,0001	10,5

^{ab} letras diferentes na mesma linha são diferentes estatisticamente após teste de Mann-Whitney

*p – valor de significância do teste estatístico

** U – valor do teste estatístico de Mann-Whitney

Nas propriedades 2, 3, 5, 6 e 7 as contagens de OPG foram iguais a zero no D14, onde o anti-helmíntico teve uma alta capacidade de reduzir a contagem de ovos nas fezes. O mesmo aconteceu na propriedade 8, onde ele reduziu os ovos

quase por completo. No restante das propriedades (1, 4, 9 e 10) a capacidade de redução foi menor.

Os resultados de OPG do D0 e do D14 foram colocados na fórmula para cálculo da taxa de redução de ovos, e assim, observou-se que nas propriedades 2, 3, 5, 6, 7 e 8 o monepantel foi altamente efetivo, nas propriedades 9 e 10 ele foi efetivo, e nas propriedades 1 e 4 ele foi insuficientemente ativo, de acordo com os padrões estabelecidos para testes de eficácia de anti-helmínticos em ruminantes pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997). Os critérios do MAPA consideram o anti-helmíntico altamente efetivo quando a eficácia é maior que 98%, efetivo quando está entre 90 e 98%, moderadamente efetivo quando é de 80 a 89% e insuficientemente ativo quando fica menor que 80%.

Os resultados de porcentagem de redução de cada propriedade estão ilustrados no mapa da microrregião estudada na Figura 5.

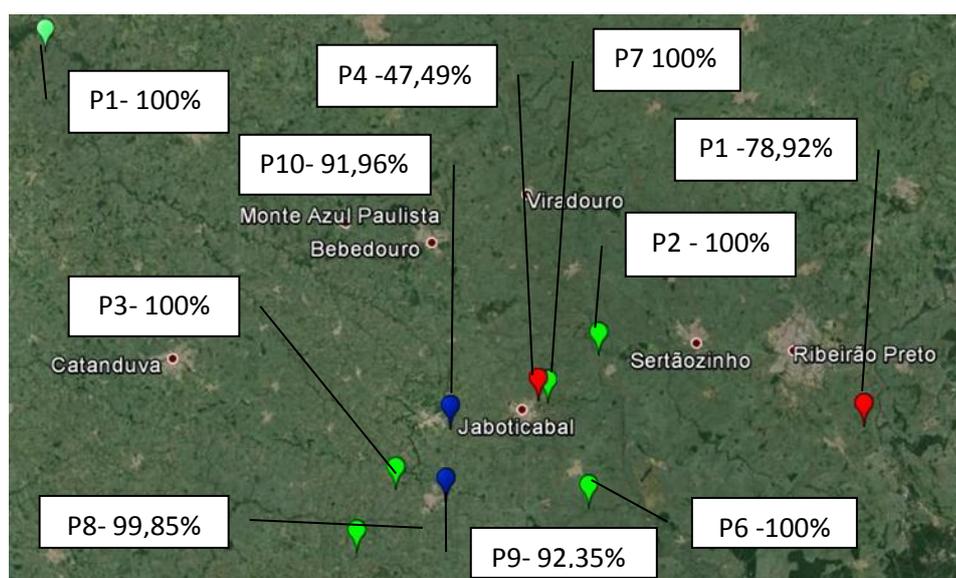


FIGURA 5. Localizações das propriedades criadoras de ovinos (P1 a P10) e eficácia do monepantel. As cores diferentes representam a eficácia do vermífugo em cada propriedade, vermelho é ineficaz, azul é eficaz e verde é altamente eficaz.

A redução dos ovos pode ser observada nos gráficos que estão agrupados de acordo com a classificação da eficácia do vermífugo. Na Figura 6 estão os resultados das propriedades que tiveram o vermífugo atuando de forma ineficaz

(vermelho), na Figura 7 das propriedades em que ele foi eficaz (azul) e na Figura 8 onde ele foi altamente eficaz (verde).

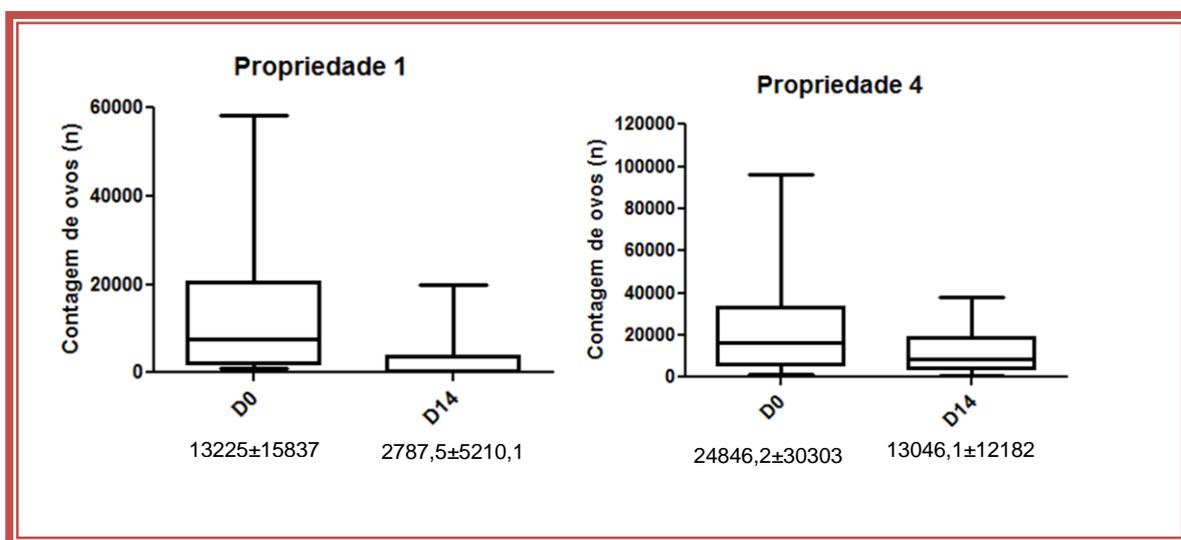


FIGURA 6. Gráficos representativos das contagens de OPG no dia 0 (dia do tratamento com monepantel) e no dia 14 com suas respectivas médias aritméticas abaixo. Resultados obtidos em duas propriedades (1 e 4) localizadas em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP onde monepantel foi ineficaz.

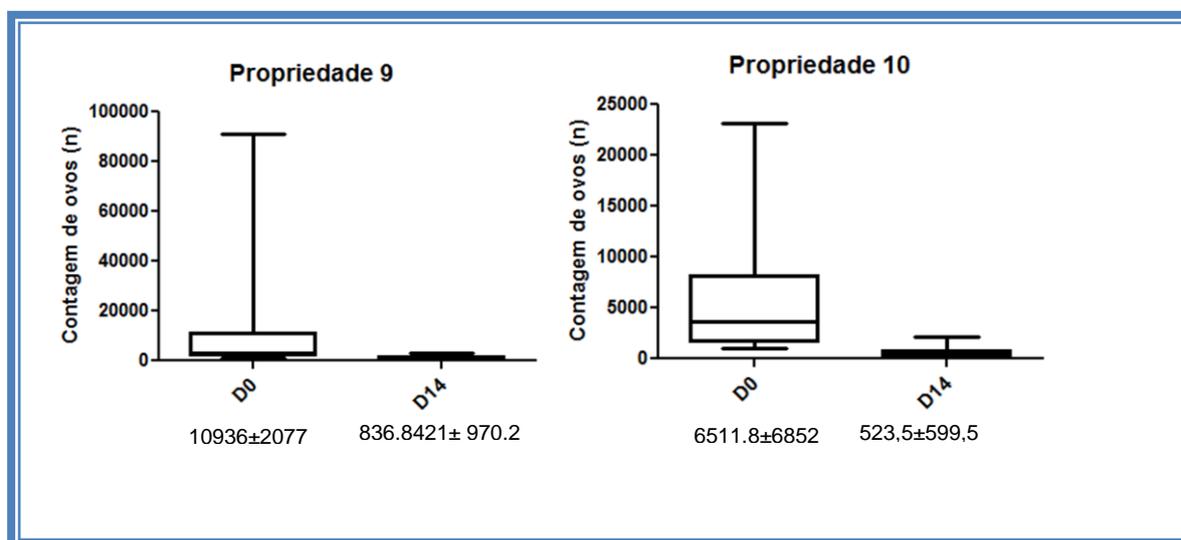


FIGURA 7. Gráficos representativos das contagens de OPG no dia 0 (dia do tratamento com monepantel) e no dia 14 com suas respectivas médias aritméticas abaixo. Resultados obtidos em duas propriedades (9 e 10) localizadas em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP onde monepantel foi eficaz.

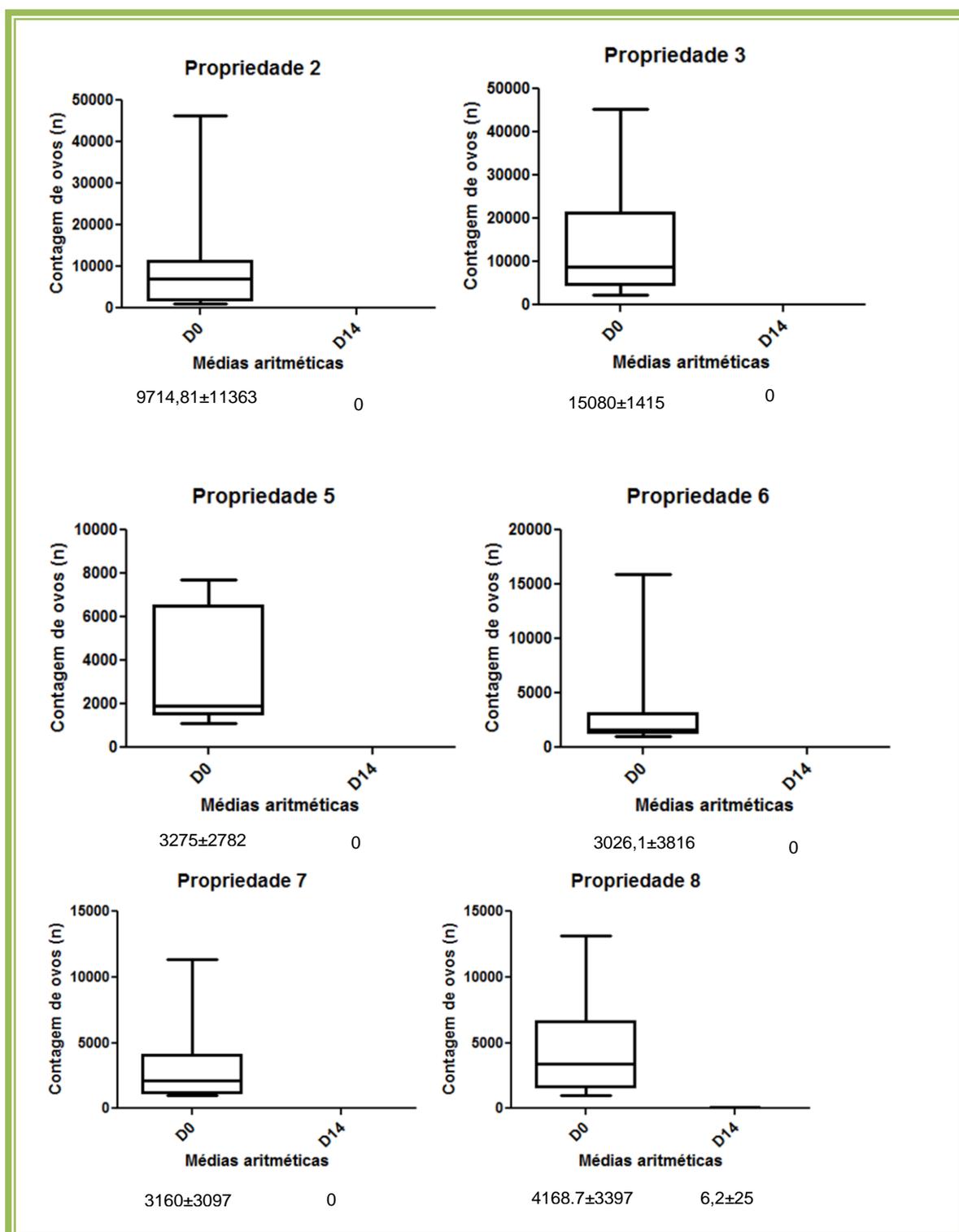


FIGURA 8. Gráficos representativos das contagens de OPG no dia 0 (dia do tratamento com monepanel) e no dia 14 com suas respectivas médias aritméticas abaixo. Resultados obtidos em seis propriedades (2, 3, 5, 6, 7 e 8) localizadas em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP onde monepanel foi altamente eficaz.

Os resultados dos exames de coprocultura são interessantes para identificação genérica dos helmintos presentes no rebanho e ainda para saber quais permanecem presentes após a administração do anti-helmíntico. Desta forma, estabelece-se uma relação entre resistência anti-helmítica e gêneros de helmintos envolvidos. Os dados da coprocultura obtidos estão representados nas figuras 9, 10, 11, 12 e 13 que estão agrupados de acordo com a classificação anterior considerando as propriedades em que o monepantel foi ineficaz, efetivo, altamente efetivo.

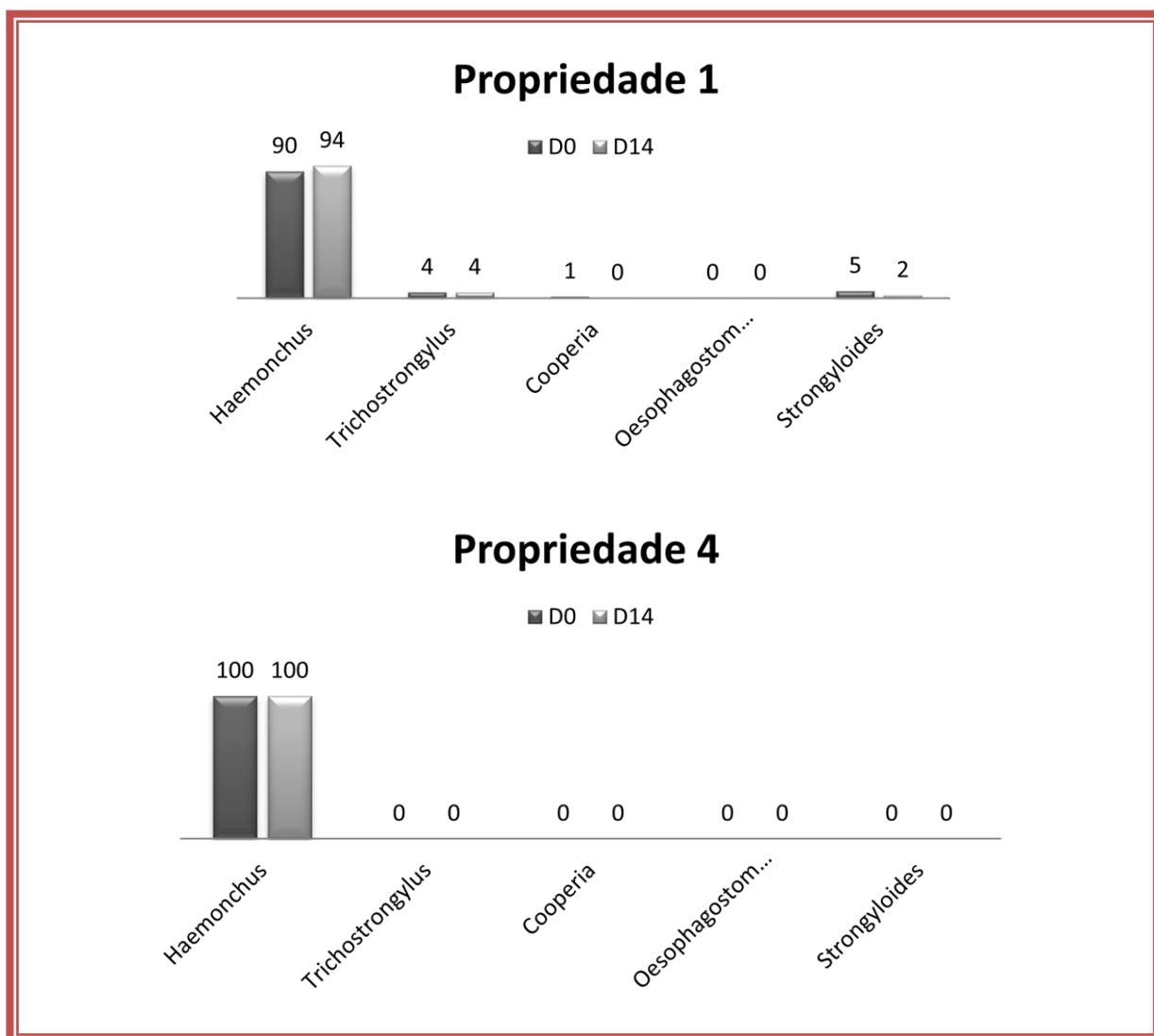


FIGURA 9. Porcentagem de L₃ de helmintos encontrados após coprocultura das fezes coletadas no dia 0 (D0) e no dia 14 (D14) nas propriedades 1 e 4 da microrregião em torno de Jaboticabal, onde o monepantel foi considerado ineficaz após teste de redução de ovos.

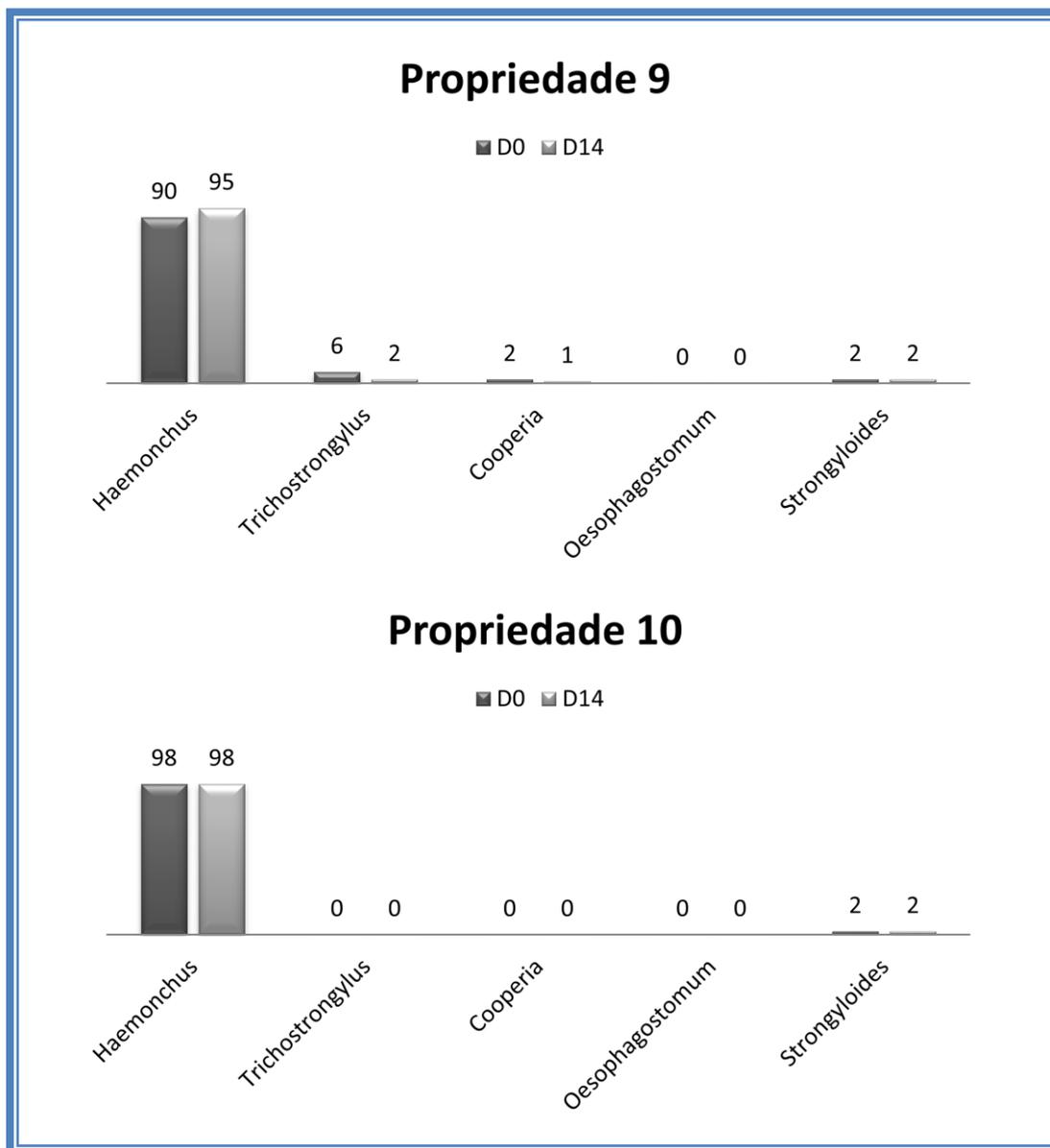


FIGURA 10. Porcentagem de L₃ de helmintos encontrados após coprocultura das fezes coletadas no dia 0 (D0) e no dia 14 (D14) nas propriedades 9 e 10 da microrregião em torno de Jaboticabal, onde o monepantel foi considerado eficaz após teste de redução de ovos.

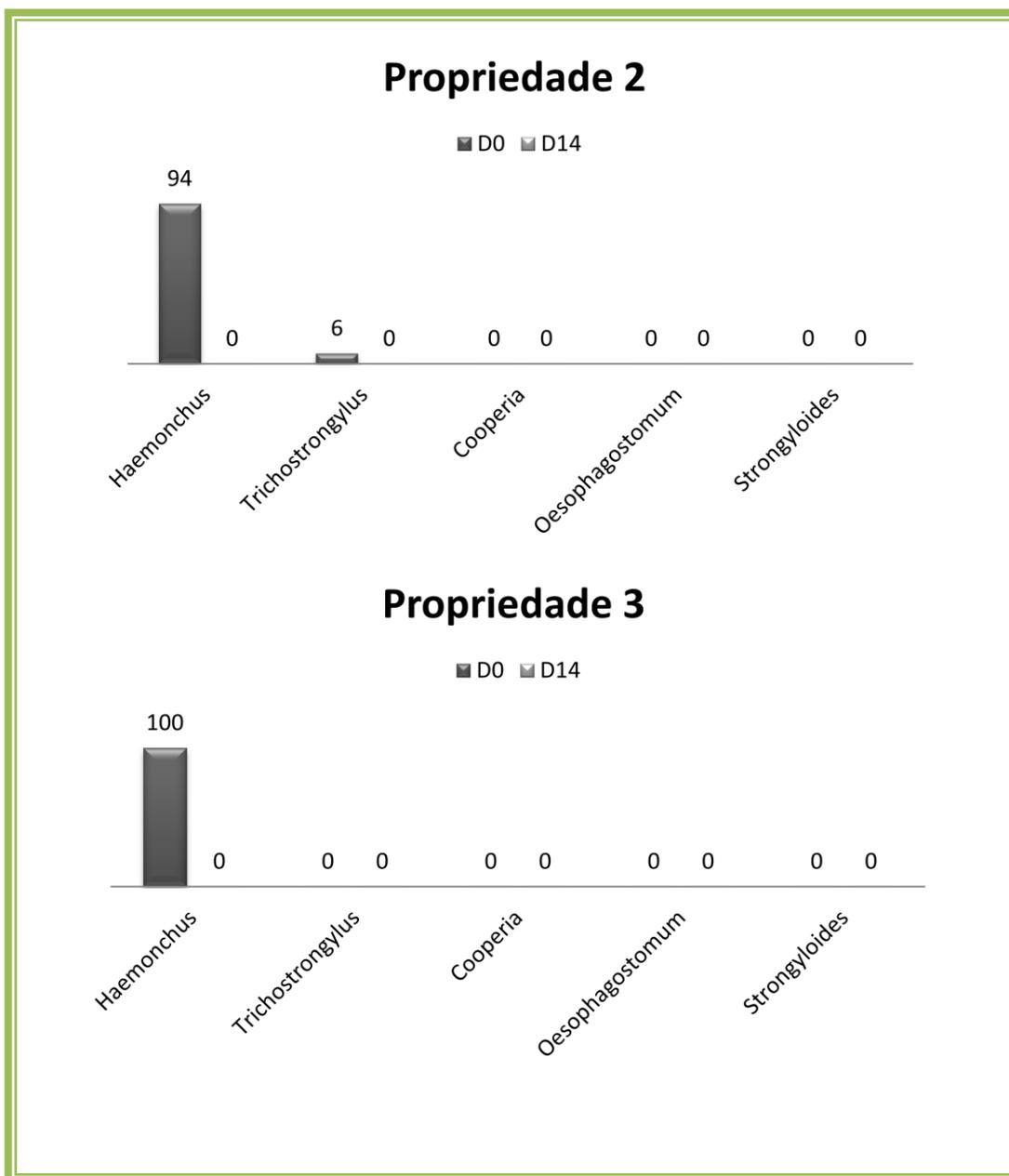


FIGURA 11. Gêneros de helmintos encontrados após coprocultura das fezes coletadas do dia 0 (D0) e no dia 14 (D14) nas propriedades 2 e 3 da microrregião em torno de Jaboticabal em que o monepantel foi considerado altamente eficaz após teste de redução de ovos.

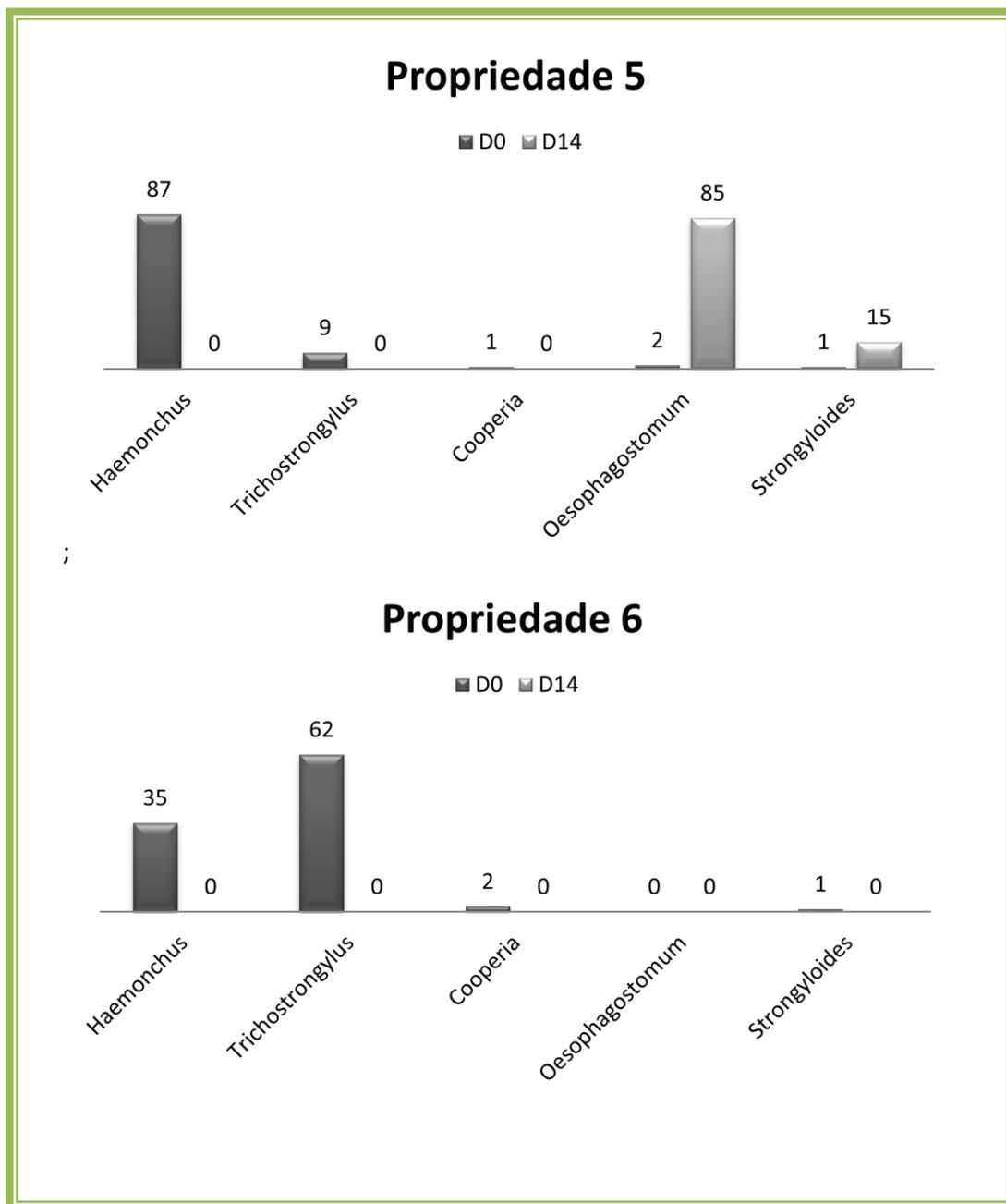


FIGURA 12. Gêneros de helmintos encontrados após coprocultura das fezes coletadas do dia 0 (D0) e no dia 14 (D14) nas propriedades 5 e 6 da microrregião em torno de Jaboticabal em que o monepantel foi considerado altamente eficaz após teste de redução de ovos.

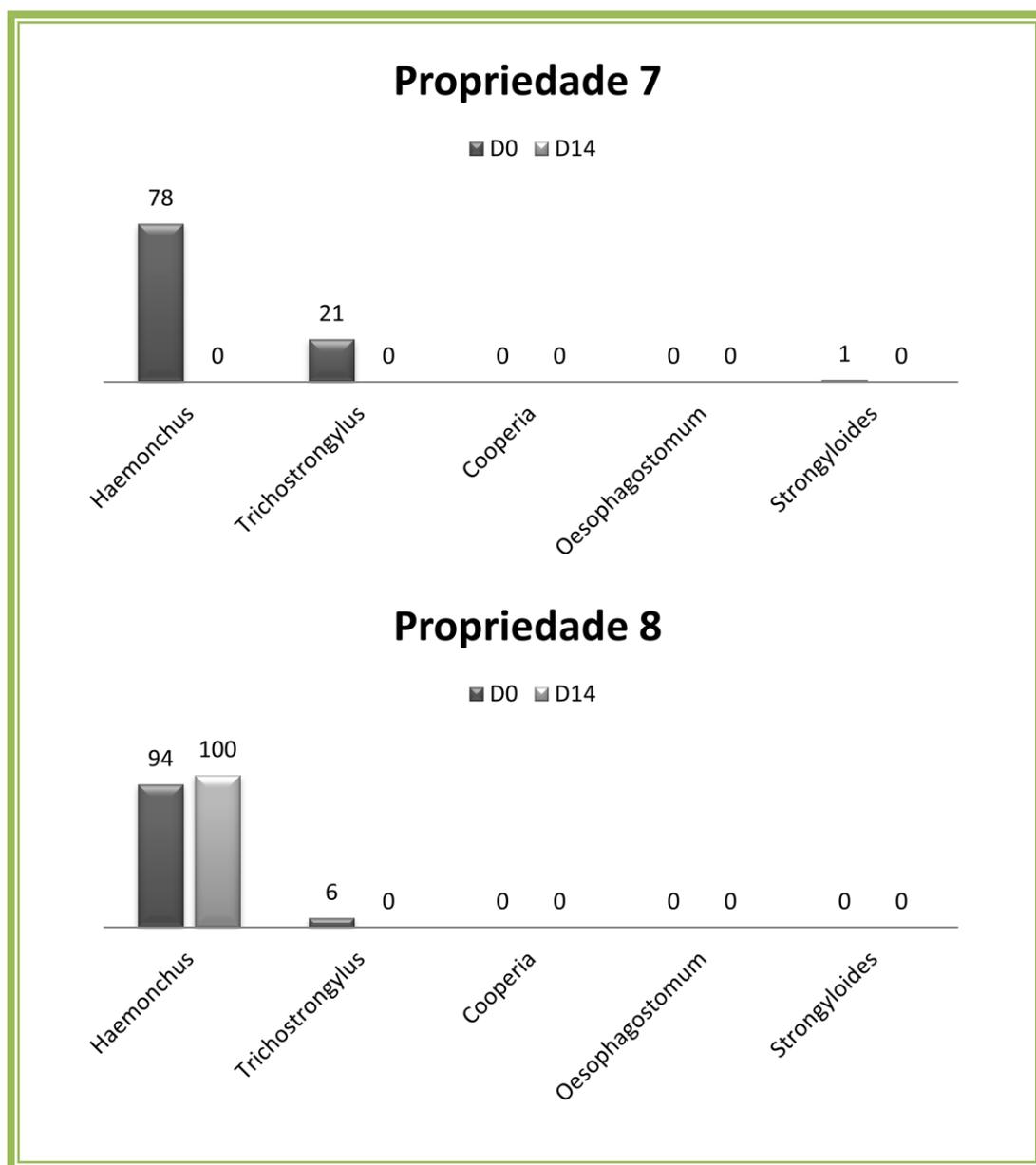


FIGURA 13. Gêneros de helmintos encontrados após coprocultura das fezes coletadas do dia 0 (D0) e no dia 14 (D14) nas propriedades 7 e 8 da microrregião em torno de Jaboticabal em que o monepantel foi considerado altamente eficaz após teste de redução de ovos.

Nas duas propriedades em que o monepantel foi insuficientemente ativo (1 e 4), e em outras duas em que o ele foi efetivo (9 e 10) as larvas do gênero *Haemonchus* estavam em maior porcentagem no D14. Portanto, o monepantel falhou em eliminar, principalmente, os helmintos deste gênero.

O primeiro relato de resistência anti-helmítica ao monepantel em ovinos relacionou principalmente os helmintos nematoides *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* (SCOTT et al., 2013). Entretanto, Mederos, Ramos e Banchemo (2014) e Van den Brom et al (2015) relataram resistência do *Haemonchus*.

Entre as dez propriedades estudadas, seis não tiveram problemas com eficácia do monepantel. Na propriedade 5 ocorreu um fato curioso, as larvas de *Oesophagostomum* e de *Strongyloides* foram as únicas encontradas após o tratamento. Já se sabe que este anti-helmíntico não tem efeito contra *Strongyloides*, e pouco se sabe sobre a ação dele sobre o *Oesophagostomum*.

Um dos primeiros estudos sobre monepantel em ruminantes, que visava determinar seu espectro de ação, observou que ele foi capaz de eliminar o *Oesophagostomum* (KAMINSKY et al., 2008b). Scott et al (2013) observaram *Oesophagostomum venulosum* na necropsia após tratamento com monepantel em ovinos na Nova Zelândia. Porém, Mederos, Ramos e Banchemo (2014) observou este nematoide pré-tratamento com monepantel e ele não apareceu na coprocultura pós-tratamento, o que implica que foi eficaz contra este gênero.

A propriedade do presente trabalho, em que ele apareceu após coprocultura, nunca havia utilizado este vermífugo, e desta forma seria importante mais estudos para se determinar a ocorrência de resistência deste helminto.

Foi realizada uma investigação sobre o histórico das propriedades na tentativa de identificar possíveis fatores de risco sobre a utilização do monepantel. Primeiramente foram levantadas informações sobre o tipo de criação. Nas duas propriedades em que o monepantel foi insuficientemente ativo (1 e 4), as raças criadas eram Poll Dorset e Dorper.

Na propriedade 1, o sistema de criação era extensivo porém com grande número de animais (1000 cabeças) em uma estrutura bastante especializada. Já na propriedade 4 o sistema de criação era semi-intensivo. Nos dois casos o grande

número de animais por área e a utilização de raças mais especializadas e menos resistentes a verminose podem ter sido importantes fatores predisponentes.

Da mesma forma, as propriedades em que o vermífugo foi eficaz, também predominavam os animais de raças mais especializadas e menos resistentes a verminose, em sistemas de criação intensivo ou semi-intensivo.

Nas seis propriedades em que o monepantel foi altamente eficaz, a raça predominante era Santa Inês ou cruzamento de Santa Inês com Dorper, em sistemas de criação extensivo, misto e intensivo. A raça Santa Inês é menos especializada para produção de carne, porém pode ser mais resistente às verminoses.

O manejo de vermifugação também foi investigado como parte importante do levantamento de fatores de risco, e os resultados estão na Tabela 4. Além disso, o histórico da utilização do monepantel nas propriedades também foi levantado, e colocado na Tabela 5.

TABELA 4. Manejo de vermifugação das dez propriedades (P) de uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP onde foi realizada pesquisa da eficácia do monepantel.

Eficácia	P	Critérios para vermifugação			Frequência	Alternância de princípios ativos	Princípios ativos já utilizados
		1*	2*	3*			
INEFICAZ	1	N/A	N/A	N/A	a cada 60 dias	Sim	Levamisol, moxidectina, doramectina
	4	-	X	X	N/A	Não	Não informado
EFICAZ	9	X	-	X	N/A	Sim	Ivermectina, doramectina, moxidectina, nitroxinil
	10	N/A	N/A	N/A	a cada 40 dias	Sim	Moxidectina, nitroxinil
ALTAMENTE EFICAZ	2	N/A	N/A	N/A	a cada 40 dias	Sim	Levamisol, ivermectina
	3	-	-	X	N/A	Não	Moxidectina, ivermectina
	5	X	-	-	N/A	Não	Albendazole, levamisol, moxidectina
	6	N/A	N/A	N/A	Três vezes ao ano	Sim	Moxidectina, nitroxinil
	7	N/A	N/A	N/A	a cada 30 dias	Sim	Closantel, moxidectina
	8	-	-	X	N/A	Sim	Ivermectina, doramectina, levamisol

*1 – Setetivo baseado em Famacha

*2 – Seletivo baseado em OPG (Ovos por grama de fezes)

*3 – Quando existe animais doentes

N/A – não se aplica

TABELA 5. Histórico da utilização do anti-helmíntico monepantel em dez propriedades (P) localizadas em uma microrregião em torno de Jaboticabal-SP.

Eficácia	P	Utilização	Período de utilização	Realização de alternância com outros princípios ativos no período de utilização do monepantel
INEFICAZ	1	sim	1 ano	Não
	4	Sim	1 ano	Não
EFICAZ	9	sim	2 anos	Sim
	10	sim	3 anos	Sim
ALTAMENTE EFICAZ	2	não	N/A	N/A
	3	sim	1 vez	N/A
	5	Não	N/A	N/A
	6	sim	3 vezes em três anos	Sim
	7	sim	3 vezes em 2 anos	Sim
	8	Não	N/A	N/A

As propriedades 1 e 4, as quais o monepantel foi ineficaz, faziam uso deste anti-helmíntico a 1 ano sem alternância com outros anti-helmínticos. A propriedade 1 utilizava ele a 1 ano com aplicações de 60 em 60 dias em todos os animais (tratamento massal). E a propriedade 4 utilizava-o também a 1 ano fazendo a administração do anti-helmíntico por acompanhamento dos animais com exames de OPG e sintomatologia clínica, e da mesma forma que a propriedade 1, de forma massiva.

Mederos, Ramos e Banchemo (2014) relataram pela primeira vez a ocorrência na América Latina de resistência ao monepantel associada ao *Haemonchus* em duas propriedades do Uruguai. Entretanto, as mesmas faziam uso do medicamento de forma seletiva, uma delas baseado nas contagens de ovos nas fezes e outra utilizando o método Famacha, e assim, após três anos de utilização falhou em reduzir os ovos nas fezes. Os resultados obtidos neste trabalho demonstra aparecimento de resistência em um período inferior ao observado no Uruguai.

As propriedades 9 e 10, as quais o anti-helmíntico foi eficaz, utilizavam-no por um período de 2 e 3 anos, respectivamente. A 9 fazia tratamentos pontuais baseado no método Famacha, porém, desde que começou a utilizar este vermífugo não alternou com nenhum, apesar de anteriormente a ele costumava-se fazer alternâncias de bases químicas. Já a propriedade 10, fazia vermifugações a cada 40 dias, entretanto, fez alternância de princípios ativos durante os três anos de utilização.

Nas propriedades em que o monepantel foi altamente eficaz, três delas nunca tinham utilizado este anti-helmíntico, a 2, 5 e 8 e outras três já haviam utilizado, sendo elas a 3, 6 e 7. A propriedade 3 já fez uso apenas uma vez no rebanho; a 6 utilizou ele três vezes em três anos (uma vez por ano) e a 7 utilizou 3 vezes em 2 anos. A propriedade 3 tem o manejo baseado no tratamento somente de animais doentes, a 6 não utiliza nenhum critério para vermifugação, entretanto, faz poucas vermifugações durante o ano e a 7 fazia vermifugações de 30 em 30 dias, entretanto alternando princípios ativos.

Desta forma, o que mais chama atenção é que a utilização do monepantel em intervalos curtos entre as aplicações, sem alternância de bases químicas, administrados de forma massiva em rebanhos de raças mais especializadas e

menos resistentes às verminoses, em sistemas de criação mais intensificados podem ter contribuído para a diminuição da eficácia deste anti-helmíntico.

É importante destacar que este anti-helmíntico é comercializado apenas em frascos de um litro, com prazo de validade curto e com preço elevado em relação aos outros anti-helmínticos. Portanto, por razões financeiras, ocorre aumento da necessidade do criador em usar somente este anti-helmíntico em um intervalo curto de tempo até acabar o volume do frasco e sem alternar com outro anti-helmíntico. Além disso, isto se torna relevante para entender que pequenos criadores não utilizam este anti-helmíntico.

Nos três trabalhos que já relataram a resistência do monepantel, sendo eles, na Nova Zelândia, Uruguai e Holanda, ela ocorreu em um período de até 4 anos após o medicamento ser colocado no mercado (SCOTT et al., 2013; MEDEROS; RAMOS; BANCHERO, 2014; VAN DEN BROM et al., 2015), semelhante ao que ocorreu no Brasil. Este período é muito inferior ao que foi observado para as avermectinas, anti-helmíntico amplamente utilizado no mundo. Gopal, Pomroy e West (1999) fizeram o primeiro relato de resistência de ivermectina após aproximadamente dez anos de utilização na Nova Zelândia.

5.2 Testes da eficácia do monepantel em ovinos experimentalmente infectados com um isolado de *H. contortus*

Em uma segunda etapa do trabalho, após a identificação das propriedades cujo anti-helmíntico monepantel foi ineficaz, e ainda, verificando que a resistência estava relacionada ao nematóide do gênero *Haemonchus*, foi conduzido teste controlado contra um isolado de *H. contortus* resistente oriundo de uma das dez propriedades estudadas.

Na Tabela 6 observa-se que o composto monepantel alcançou maior percentual de eficácia terapêutica no D14, com valor de 32,89% e maior percentual de redução de OPG de 15,27% no D2. Os valores não sofreram variações de forma linear porque estes dados são apenas estimativas da quantidade de helmintos nos animais. Apesar disso, pode-se considerar com segurança que o anti-helmíntico

demonstrou-se resistente segundo os critérios estabelecidos por Coles et al. (1992), apresentando eficácia inferior a 95%.

Avaliando-se a redução de ovos no D14, observou-se o valor de 5,97% (tabela 6), não observando diferença estatística entre o dia 0 e o dia 14 ($U=11,00$ e $P=0,8413$) o que implica dizer que o anti-helmíntico foi insuficientemente ativo. Isto comprovou o que já havia sido observado nos animais naturalmente infectados que estavam parasitados por outros gêneros de helmintos além do *Haemonchus*.

TABELA 6. Percentuais de redução e de eficácia dos valores médios das contagens de ovos de nematódeos (Estrongilídeos) por grama de fezes (OPG) em ovinos dos grupos controle e tratado, nas datas pós-tratamento.

Dias pós-tratamento	Grupos experimentais/Valores médios contagens de ovos de nematódeos (OPG)		Percentuais de redução (%)	Percentuais de eficácia (%)
	GI: Controle	GII: Monepantel 2,5%*		
D0	28925,00 ^{Aa}	25140,00 ^{Aa}	-	-
D2	19850,00 ^{Aa}	21300,00 ^{Aa}	15,27	0,00
D4	28900,00 ^{Aa}	24780,00 ^{Aa}	1,43	14,26
D6	28950,00 ^{Aa}	22980,00 ^{Aa}	8,59	20,62
D8	22125,00 ^{Aa}	22340,00 ^{Aa}	11,14	0,00
D10	30600,00 ^{Aa}	27600,00 ^{Aa}	0,00	9,80
D12	27125,00 ^{Aa}	33480,00 ^{Aa}	0,00	0,00
D14	35225,00 ^{Aa}	23640,00 ^{Aa}	5,97	32,89

*Valores seguidos por letras iguais, na coluna (A) e na linha (a), não diferem entre si pelo teste t simples ($p>0,05$)

Posteriormente, os mesmos dez animais foram eutanasiados quatorze dias após a administração do anti-helmíntico para identificação e quantificação de *Haemonchus contortus* presentes no abomaso. Entretanto, um animal do grupo controle foi retirado das análises por ter sido observado que o mesmo estava com a carga parasitária muito abaixo do restante do grupo, sugerindo que as larvas infectantes não conseguiram se estabelecer neste animal, o que provavelmente está relacionada a resistência imunológica individual.

Analisando-se os resultados da contagem dos helmintos no grupo controle (n=4) e no grupo tratado (n=5), determinou-se eficácia do monepantel de 24,65% (tabela 7), o que está abaixo da eficácia desejada de no mínimo 95% podendo o vermífugo ser considerado insuficientemente ativo.

TABELA 7. Número médio de *Haemonchus contortus* recolhidos de ovinos pertencentes aos grupos controle e tratado com monepantel; percentuais de eficácia.

Espécie de helminto	Grupos experimentais/Número de médio de helmintos		Percentual de eficácia (%)
	GI: Controle	GII: Monepantel 2,5%*	
<i>Haemonchus contortus</i>	4186,75 ^A	3154,60 ^A	24,65

*Valores seguidos por letras iguais, na linha, não diferem entre si pelo teste t simples ($p > 0,05$)

Portanto, na propriedade que tinha esta linhagem resistente de *Haemonchus contortus*, os resultados do teste crítico confirmaram os outros que foram encontrados no teste de redução de ovos em animais naturalmente infectados e em animais experimentalmente infectados. As taxas de redução de ovos foram de 78,92% e 5,96 % nos testes de redução da contagem de ovos em animais naturalmente e experimentalmente infectados, respectivamente. A eficácia após teste crítico foi de 24,65%.

O primeiro relato mundial de resistência ao monepantel aconteceu na Nova Zelândia com 0% de redução de ovos nas fezes tanto em ovinos quanto em caprinos, o que foi confirmado após realização de teste crítico confirmatório em ovinos. Neste caso os principais helmintos envolvidos foram *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* (SCOTT et al., 2013).

Sabe-se que o tratamento massal a intervalos curtos aumentam a pressão de seleção para resistência anti-helmíntica, diminuindo a população de larvas em refugia (SANGSTER, 1999; VAN WYK, 2001). Estes fatores podem ter contribuído para o aparecimento da resistência na propriedade estudada de forma tão rápida, após um ano de utilização com aplicações de 60 em 60 dias. Tanto neste estudo, como no realizado por Mederos, Ramos e Banchemo (2014), as propriedades utilizavam o monepantel como único vermífugo desde a sua primeira utilização. Mederos, Ramos e Banchemo (2014) observaram eficácia terapêutica de 0,0% e 42,0% com monepantel adquirido de estoque comercial e do próprio fornecedor, respectivamente e em outra propriedade, observou eficácia de 82,1%. Em ambas as criações a eficácia após 3 anos foi ainda maior que neste estudo após 1 ano de uso.

No que diz respeito à resistência contra *Haemonchus contortus* na maioria dos municípios do estado São Paulo, o presente estudo corrobora com os resultados de resistência encontrados em outras classes de medicamento como oxfendazol, levamisol, ivermectina e moxidectina (AMARANTE et al., 1992; BUZZULINI et al., 2007).

É bastante registrada a informação de que não há parcimônia na utilização de anti-helmíntico em rebanhos ovinos nas propriedades rurais. Tal fato é reconhecido como agravante, justificando a ocorrência de resistência do presente estudo, uma vez que foi relatado pelo produtor a utilização contínua com alta frequência de tratamentos em pequenos intervalos de tempo, colaborando para a seleção de populações resistentes.

Apesar da maioria dos estudos comprovarem a alta eficácia do monepantel 2,5% no teste de redução de contagens de ovos por grama de fezes (OPG) recomenda-se a realização de outros estudos em outras estirpes com metodologias que incluam teste crítico *in vivo*, a fim de melhorar acurácia dos resultados de eficácia terapêutica do monepantel 2,5% nos nematódeos parasitos de ovinos.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que helmintos de ovinos já estão resistentes ao monepantel em criações brasileiras localizadas no estado de São Paulo, especialmente o *Haemonchus contortus*.

Para que este anti-helmíntico continue tendo boa eficácia, onde ainda não está ocorrendo resistência, é importante evitar vermifugações com alta frequência durante o ano e também utilização do monepantel como único anti-helmíntico na propriedade.

Pode-se concluir também, que se torna importante o papel do médico veterinário na orientação do melhor manejo com anti-helmínticos em cada tipo de criação.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. 2003. p. 791-818.

AMARANTE, A. F. T., BARBOSA, M. A, OLIVEIRA, M. A. G., CARMELLO, M. J. E PADOVANI, C. R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, p.31-38, 1992.

BRASIL. Portaria Nº 48/97. Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. Brasília: MAPA, 1997

BUZZULINI, C.; SILVA-SOBRINHO, A. G.; COSTA, A. J.; SANTOS, T. R.; BORGES, F. A.; SOARES, V. E. Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação Albendazol, Levamisole e Ivermectina à Moxidectina em ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n.6, p.891-895, 2007.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA-CFMV. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados**. Brasília, DF: CFMV. 2012, 62p.

CAVALCANTE, C. R. C.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. **Doenças parasitárias de ovinos e caprinos: epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 603p.

CHESSA, B.; PEREIRA, F.; ARNAUD, F.; AMORIM, A.; GOYACHE, F.; MAINLAND, I.; KAO, R. R.; PEMBERTON, J. M.; BERARDI, D.; STEAR, M. J.; ALBERTI, A.; PITTAU, M.; IANUZZI, L.; BANABAZI, M. H.; KAZWALA, R. R.; ZHANG, Y.; ARRANZ, J. J.; ALI, B. A.; WANG, Z.; UZUN, M.; DIONE, M. M.; OLSAKER, I.; LARS-ERIK, H.; SAARMA, U.; AHMAD, S.; MARZANOV, N.; EYTHORSDDOTTIR, E.; HOLLAND, M. J.; AJMONE-MARSAN, P.; BRUFORD, M. W.; KNATANEN, J.; SPENCER, T. E.; PALMARINI, M. Revealing the History of Sheep Domestication Using Retrovirus Integrations. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 532-536, 2009.

COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p.167–185, 2006.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, p.35- 44, 1992.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p.65-71, 2011.

COSTA, A. J. **Diagnóstico laboratorial em Parasitologia**. I. Helmintologia. FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP. 2013.

DOBSON, R. J.; SANGSTER, N. C.; BESIÉ, R. B.; WOODGATE, R. G. Geometric means provide a biased efficacy result when conducting a faecal egg count reduction test (FECRT). **Veterinary Parasitology**, v.161, p.162–167, 2009.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p.199-206, 1996.

GEORGE, S. D.; GEORGE, A. J.; STEIN, P. A.; ROLFE, P. F.; HOSKING, B. C.; SEEWALD, W. The comparative efficacy of abamectin, monepantel and anabamectin/derquantel combination against fourth-stage larvae of a macrocyclic lactone resistant *Teladorsagia spp.* isolate infecting sheep. **Veterinary Parasitology**, v.188, p.190–193, 2012.

GOPAL, R. M.; POMROY, W. E.; WEST, D. M. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectina. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p.781-786, 1999.

HOSKING, B. C.; KAMINSKY, R.; SAGER, H.; ROLFE, P. F.; SEEWALD, W. A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. **Parasitology Research**, v.106, p.529–532, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>, acessado em: 07/08/2015.

KAMINSKY, R.; BAPST, B.; STEIN, P. A.; STREHLAU, G. A.; ALLAN, B. A.; HOSKING, B. C.; ROLFE, P. F.; SAGER, H. Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multiresistent nematodes of sheep. **Parasitology Research**, v.109, p.19–23, 2011.

KAMINSKY, R.; GAUVRY, N.; SCHORDERET WEBER, S.; SKRIPSKY, T.; BOUVIER, J.; WENGER, A.; SCHROEDER, F.; DESAULES, Y.; HOTZ, R.; GOEBEL, T.; HOSKING, B. C.; PAUTRAT, F.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; DUCRAY, P. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. **Parasitology Research**, v.103, p.931–939, 2008a.

KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; SCHORDERET, W. S.; WENGER, A.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; GOEBEL, T.; GAUVRY, N.; PAUTRAT, F.; SKRIPSKY, T.; FROELICH, O.; KOMOIN-OKA, C.; WESTLUND, B.; SLUDER, A.; MASER, P. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, v.452, p.176–180, 2008b.

LECOVÁ, L.; STUHLÍKOVÁ, L.; PRCHAL, L.; SKÁLOVÁ, L. Monepantel: the most studied new anthelmintic drug of recent years. **Parasitology**, v.141, p.1686–1698, 2014.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. Burgess: Minneapolis, 1968. 600p.

LUX HOPPE, E.G.; TESTI, A. Aspectos sanitários fundamentais à ovinocultura comercial. **Casa da Agricultura**, ano 15, n. 3, p. 29 – 31, 2012.

MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**, v.154, p.11-34, 1997.

MCCAVERA, S.; WALSH, T. K.; WOLSTENHOLME, A. J. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. **Parasitology**, v.134, p.1111–1121, 2007.

MEDEROS, A. E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G. E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites & Vectors**, v.7, p.598, 2014.

MEJÍA, M. E.; IGARTÚA, B. M. F.; SCHMIDT, E. E.; CABARET, J. Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? **Veterinary Research**, n.34, p. 461–467, 2003.

MILLER, D. K.; CRAIG, T. M. Use of anthelmintic combinations against multiple resistant *Haemonchus contortus* in Angora goats. **Small Ruminant Research**, v. 19, p.281-283, 1996.

PRICHARD, R. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 54, p.259-268, 1994.

PRICHARD, R. K.; ROULET, A. ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. **Parasitology**, v.134, p.1123–1132, 2007.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; SOUZA, A. P. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v.32, n.3, p.473-477, 2002.

ROBERTS F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1, p.99-102, 1950.

RUFENER, L.; KEISER, J.; KAMINSKY, R.; MASER, P.; NILSSON, D. Phylogenomics of Ligand-Gated Ion Channels Predicts Monepantel Effect. **PLoS Pathogens**, v.6, n.9, p.e1001091, 2010.

RUFENER, L.; MASER, P.; RODITI, I.; KAMINSKY, R. *Haemonchus contortus* Acetylcholine Receptors of the DEG-3 Subfamily and Their Role in Sensitivity to Monepantel. **PLoS Pathogens**, v.5, n.4, p. e1000380, 2009.

SAGER, H.; BAPST, B.; STREHLAU, G. A.; KAMINSKY, R. Efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against adult stages of a multiresistent *Haemonchus contortus* isolate. **Parasitology Research**, v.111, p.2205–2207, 2012.

SANGSTER, N.C. Anthelmintic resistance: past, present and future. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.115-124, 1999.

SCOTT, I.; POMROY, B.; PAUL, K.; GREG, S.; BARBARA, A.; MOSS, A: Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v.198, p.166–171, 2013.

SCZESNY-MORAES, E. A.; BIANCHIN, I.; SILVA, K.F. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.3, p.229-236, 2010.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5ed (Reimpr). Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. 2014. p. 501-530.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**.4. Ed. Japan: Japan International Cooperation Agency, 1998, 143p.

VAN DEN BROM, R.; MOLL, L.; KAPPERT, C.; VELLEMA, P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.209, 278–280, 2015.

VAN WYK, J. A.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**, v.119, p.277–306, 2004.

VAN WYK, J. A.; MALAN, F. S; RANGLES, J. L. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the anthelmintics? **Veterinary Parasitology**, v. 70, p.111– 122, 1997.

VAN WYK, J. A. Refugia - overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.68, p.55-67, 2001.

VERCRUYSSSE, J.; HOLDSWORTH, P.; LETONJA, T.; BARTH, D.; CONDER, G. e, HAMAMOT, K.; o OKANO, K. International harmonisation of Anthelmintic Efficacy Guidelines. **Veterinary Parasitology**, v.96; p.171–193, 2001.

VERCRUYSSSE, J.; HOLDSWORTH, P.; LETONJA, T.; CONDER, G.; HAMAMOTO, K.; OKANO, K.; REHBEIN, S. International harmonisation of anthelmintic efficacy guidelines (Part 2). **Veterinary Parasitology**, v.103, p.277–297, 2002.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Revista de Ciência e Tecnologia Agropecuária**, v. 2, p. 28-31, 2008.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; KASSAI, T.; MALONE JR, J. B.; PANKAVIC, J. A.; REINECKE, R. K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S. M.; VERCROYSSSE, J. 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**, v. 58, p. 181-213, 1995.

ANEXO 1**ROTEIRO PARA LEVANTAMENTO DO HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO DO ZOLVIX
E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS****Propriedade e proprietário:**

- 1) Tamanho estimado da criação?
- 2) Quais raças criadas?
- 3) Qual a raça predominante?
- 4) Qual o sistema de criação?
- 5) Quais os vermífugos que já foram utilizados?
- 6) Qual a frequência de vermifugações?
 - a) uma vez por ano
 - b) duas vezes por ano
 - c) de 3 em 3 meses
 - d) uma vez por mês
 - e) não sabe informar
- 6) Utiliza algum critério para realizar a vermifugação?
 - a) Sim
 - b) Não
- 7) Em caso afirmativo, especificar:
 - a) Estratégico
 - b) Seletivo –Famacha
 - c) Seletivo – OPG
 - d) Quando existe animais doentes
 - e) não sabe informar
- 8) Já foi utilizado Zolvix?
- 9) Há quanto tempo ocorreu a primeira utilização?
- 10) Quantas vezes ele já foi utilizado?
- 11) Em casos de utilização mais de uma vez, foi alternado com outro vermífugo ou foi o único utilizado?

ANEXO 2

ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Resistência de *Haemonchus contortus* ao monepantel em ovinos: testes de eficácia através de redução de contagem de ovos e controlado randomizado

***Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep: Fecal egg count reduction and randomized controlled tests**

RESUMO

Verminoses são uma das principais causas de prejuízo econômico na ovinocultura, cujo controle depende essencialmente de fármacos anti-helmínticos. Depois de décadas sem o surgimento de novos grupos químicos de fármacos, uma nova classe de anti-helmínticos, os derivados da aminoacetona, representados pelo monepantel, foram lançados no mercado. Com o objetivo de avaliar um relato de baixa eficácia do monepantel em uma propriedade produtora de ovinos do município de Taiúva, estado de São Paulo, foi realizado um teste de redução de contagem de ovos e um teste crítico em uma linhagem de *Haemonchus contortus* obtida da propriedade. Dez animais foram infectados experimentalmente com 5000 larvas de terceiro estágio o isolado de *Haemonchus contortus*, e estes animais foram divididos em dois grupos, controle e tratados, em dependência do tratamento com monepantel. Foram avaliados a redução de ovos nas fezes nos dias 0, 2, 4, 7 e 14 pós-tratamento e a eficácia terapêutica ao final do período. A redução da contagem de ovos foi observada a partir do 2º dia pós-tratamento (DPT), com redução máxima, de 32,89%, registrada no 14º DPT. O teste crítico revelou eficácia de apenas 24,65%, evidenciando resistência ao princípio ativo. A ineficácia do monepantel pode estar associada a utilização do vermífugo de forma massiva, uma vez que o produtor administrava o produto em intervalos inferiores a um mês, sem orientação técnica ou critério definido. Dado que o anti-helmíntico foi usado na propriedade por período inferior a um ano, de acordo com o produtor, pode-se sugerir que *Haemonchus contortus* desenvolva resistência ao monepantel em poucas gerações caso o produto seja utilizado incorretamente.

Palavras-chave: eficácia, anti-helmíntico, derivados da aminoacetona, ovinos

ABSTRACT

Helminthiasis are one of the major causes of economic losses in the sheep industry. The control of these pathogens depends essentially on anthelmintic drugs. After decades without the emergence of new chemical groups, a new anthelmintic class denominated aminoacetonitrile derivatives, represented by monepantel, was released in the market. In order to evaluate a report of low efficacy of monepantel in sheep farm from Taiúva, state of São Paulo, fecal egg count reduction and critical tests were accomplished with *Haemonchus contortus* lineage obtained in this farm. For that, ten animals were experimentally infected with 5000 *H. contortus* third-stage larvae, and these animals were divided into two groups, Control and Treated, in dependence on treatment with Monepantel. The parameters evaluated were reduction of eggs in the feces on days 0, 2, 4, 7 and 14 post-treatment and therapeutic efficacy at the end of the period. Maximum egg count reduction was observed on day 2 post-treatment (DPT), with a maximum reduction of 32.89% registered in the 14 DPT. The critical test showed efficacy of 24.65%, showing resistance to the molecule. The ineffectiveness of monepantel may be associated with the suppressive use of the anthelmintic, as the farmer administered it in intervals of less than one month, without orientation or technical criteria. Since the anthelmintic was used on this farm for less than one year, according to the producer, it can be suggested that *H. contortus* develops resistance monepantel in a few generations if the product is used incorrectly.

Key words: efficacy, anthelmintic, aminoacetonitrile derivatives, sheep.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura enfrenta frequente obstáculo relacionado às perdas econômicas ocasionadas pelas parasitoses gastrintestinais, especialmente aos prejuízos decorrentes da infecção por *Haemonchus contortus*, importante nematódeo hematófago parasita do abomaso desses animais. Os danos acarretados por esses parasitos incluem comprometimento do crescimento, redução do ganho ou perda de peso e da produção de leite e morte de alguns animais, nos casos mais graves. A forte dependência do controle químico desse parasita, prejudicado pela constante observação de resistência aos anti-helmínticos, torna-se um agravamento à produção (WALLER, 1997; SANGSTER; GILL, 1999; WOLSTENHOLME et al., 2004; FLEMING et al., 2006; LECOVÁ et al., 2014). Como agravante a essa situação, o alto custo necessário para desenvolvimento de novas moléculas com ação anti-helmíntica resulta em baixa disponibilidade de grupos químicos diferentes para o tratamento de verminoses (PRICHARD, 1994).

Um novo grupo de anti-helmínticos, denominado derivados de aminoacetonitrila, surgiu recentemente como solução para rebanhos afetados por parasitas multi-resistentes a antiparasitários, um problema crescente que afeta rebanhos ovinos em todo o planeta. O único representante deste grupo disponibilizado comercialmente, o monepantel, foi liberado primeiramente na Nova Zelândia, em 2009 (HOSKING et al., 2010), chegando ao mercado brasileiro em 2012. Algumas características do produto, como baixa toxicidade e amplo espectro de eficácia contra nematódeos de ovinos tornaram o monepantel uma ótima escolha para o tratamento do rebanho (KAMINSKY et al., 2008, 2011).

Embora o monepantel tenha sido um grande avanço no tratamento de helmintoses gastrointestinais de ovinos, propriedades que utilizaram esse fármaco como única opção de tratamento registraram falha da ação após períodos curtos. Na Nova Zelândia, três anos após o início da comercialização do produto, surgiu o primeiro relato de *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* resistentes em uma propriedade criadora de ovinos e caprinos que utilizava o vermífugo a menos de dois anos (SCOTT et al., 2013). Da mesma forma, MEDEROS; RAMOS; BANCHERO et al. (2014) e Van den Brom et al. (2015) observaram resistência precoce em rebanhos de ovinos do Uruguai e Holanda, respectivamente, destas vezes envolvendo *Haemonchus contortus* resistente.

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia do monepantel sobre um isolado de *Haemonchus contortus* proveniente de propriedade de ovinos com relato de falha terapêutica por meio de estudos controlados de redução da contagem de ovos e teste crítico.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da linhagem

Os nematódeos utilizados para o presente estudo são provenientes do rebanho ovino de uma propriedade rural do município de Taiúva, estado de São Paulo. O rebanho era formado por cerca de 100 animais Santa Inês criados em regime extensivo. O produtor utilizava o monepantel como única alternativa para o controle de helmintos, tratando todos os animais de forma supressiva, com intervalos entre tratamentos inferior a trinta dias durante um ano, até que suspeitou-se da ineficácia terapêutica do produto.

Para estabelecimento da cultura pura, necessária para o desenvolvimento do estudo, foram utilizadas fêmeas adultas de *Haemonchus contortus* obtidas da necropsia de dois animais da propriedade. As fêmeas foram colocadas em placas de Petri com solução salina a 0,9% e mantidas em estufa B.O.D. a 37°C e umidade superior a 80% para oviposição in vitro. Ao final de um período de 48h00 os ovos resultantes foram misturados a fezes de cavalos livres de parasitas e maravalha e

submetidos ao método de Roberts e O'Sullivan (UENO; GONÇALVES, 1998) para obtenção de larvas infectantes. Estas foram administradas a dois animais doadores, mantidos em gaiolas suspensas, de modo a permitir a obtenção de ovos na quantidade necessária para infecção dos animais dos grupos experimentais.

As larvas necessárias para o inóculo dos grupos experimentais foram obtidas por coprocultura das fezes dos animais doadores e mantidas refrigeradas em geladeira doméstica a 6°C por uma semana.

Formação dos grupos experimentais

Doze ovinos mestiços Texel x Dorper com seis meses de idade, identificados por brincos, foram mantidos em duplas em gaiolas suspensas, com dieta baseada em silagem de milho mais concentrado comercial para ovinos e água a vontade. No início do mês de adaptação, os animais foram tratados com moxidectina, monepantel, e triclorfon para eliminação de qualquer infecção pré-existente, confirmados por dois resultados negativos aos 15 e 30 dias desse período.

Os doze animais receberam por via oral inóculo de 5000 larvas infectantes da cultura de *H. contortus*. Exames de fezes pelo método de Gordon e Whitlock (modificado por UENO; GONÇALVES, 1998) foram realizados a partir da 2ª semana pós-infecção para determinação do início do período patente. Após o período de patência (32 dias) os ovinos foram alocados nos grupos experimentais levando-se em conta médias de OPG do dia -1, como critério para sua distribuição aos pares em cinco blocos. Dentro de cada bloco, os animais foram aleatoriamente alocados ao grupo de tratamento. Após a formação dos grupos, cinco animais foram tratados no dia experimental zero (D0) por via oral com monepantel na dose de 2,5 mg Kg⁻¹ (Zolvix – Novartis Saúde Animal), de acordo com recomendações do fabricante, enquanto os animais do grupo Controle receberam apenas água destilada.

Teste de Redução da contagem de ovos por grama de fezes OPG

Amostras de fezes dos animais dos dois grupos experimentais foram colhidas diretamente do reto, evitando assim possíveis contaminações. As amostras foram identificadas com o número do animal e data de colheita. As contagens de ovos, realizadas prontamente após a coleta das fezes, foram feitas nos dias 0, 2, 4, 6, 7 e 14 do período experimental.

Teste crítico

Ao 14^o dia pós-infecção, todos os animais foram abatidos para retirada do abomaso após ligadura das extremidades. Em seguida, cada abomaso foi aberto pela curvatura maior para lavagem em água corrente. Todo o conteúdo abomasal obtido pela lavagem foi tamisado em tamises com malha metálica Tyler 48 para concentração das amostras, que foram armazenadas em frascos plásticos acrescidos de solução de Railliet e Henry (formol 5 mL, ácido acético 2 mL, solução salina 0,9% 93 mL) pré-aquecida (WOOD et al., 1995).

A carga parasitária total dos conteúdos abomasais foi coletada utilizando-se estereomicroscópio e suas identificações específicas realizadas por meio da avaliação morfológica do nematódeo. A identificação específica foi feita de acordo com Ueno e Gonçalves (1998).

Análise dos dados

A análise dos resultados dos testes de redução de ovos realizados em animais infectados naturalmente e experimentalmente, foi feita a partir dos resultados das contagens de OPG inicial (DO) e OPG final (D14). Para realizar este cálculo, foram consideradas as contagens de OPG de cada grupo no dia zero (OPG inicial), ou seja, cada grupo experimental, antes de receber o tratamento, desempenhou a função de controle (COLES et al., 1992), como mostra a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de Redução} = \frac{\text{Média de OPG inicial} - \text{Média de OPG final}}{\text{Média de OPG inicial}} \times 100$$

As médias aritméticas foram utilizadas para estimar a percentagem de redução de helmintos, para cada grupo, pela fórmula preconizada pelo MAPA (1997) e Vercruysse et al. (2001), descrita abaixo. Entretanto para determinação de populações resistentes, utilizou-se a média aritmética, conforme preconizam recentes estudos (DOBSON et al., 2009, VERCRUYSSSE et al., 2002).

$$\% \text{ de Eficácia} = \frac{\text{Média do n}^\circ \text{ de helmintos do grupo controle} - \text{Média do n}^\circ \text{ de helmintos do grupo tratado}}{\text{Média do n}^\circ \text{ de helmintos do grupo controle}} \times 100$$

As médias de contagens de ovos log-transformadas e a contagem total de adultos em cada um dos testes foram comparadas por teste t simples ou Mann-Whitney, em dependência do padrão de distribuição dos valores.

Aspectos éticos

Todos os procedimentos adotados estão em acordo com normas vigentes de bem-estar animal e foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FCAV, protocolo número 013124/13.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto monepantel 2,5% (Zolvix®, Novartis Saúde Animal) alcançou eficácia terapêutica máxima no 14º dia pós-tratamento (DPT) de 32,89% e percentual de redução de OPG de 15,27% no 2º DPT (média aritmética), demonstrando-se resistente segundo os critérios estabelecidos por Coles et al. (1992), apresentando eficácia inferior a 95% descritas na tabela 1.

Sabe-se que o tratamento massal a intervalos curtos aumentam a pressão de seleção para resistência anti-helmíntica, diminuindo a população de larvas em refugia (SANGSTER, 1999; VAN WYK, 2001). Estes fatores podem ter contribuído para o aparecimento da resistência na propriedade estudada de forma tão rápida, após um ano de utilização com aplicações de 60 em 60 dias. Medeiros et al (2014) relataram pela primeira vez a ocorrência na América Latina de resistência ao monepantel associada ao *Haemonchus* em duas propriedades do Uruguai. Entretanto, as mesmas faziam uso do medicamento de forma seletiva, uma delas baseado nas contagens de ovos nas fezes e outra utilizando o método Famacha, e assim após três anos de utilização falhou em reduzir os ovos nas fezes. Tanto neste estudo, como no realizado por Medeiros et al. (2014), as propriedades utilizavam o monepantel como único vermífugo desde a sua primeira utilização. Medeiros et al (2014) observaram eficácia terapêutica de 0,0% e 42,0% com monepantel adquirido de estoque comercial e do próprio fornecedor, respectivamente e em outra propriedade, observou eficácia de 82,1%. Em ambas as criações a eficácia após 3 anos foi ainda maior que neste estudo após 1 ano de uso.

O primeiro relato mundial de resistência ao monepantel aconteceu na Nova Zelândia com 0% de redução de ovos nas fezes tanto em ovinos quanto em caprinos, o que foi confirmado após realização de teste crítico confirmatório em ovinos. Neste caso os principais helmintos envolvidos foram *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* (SCOTT et al., 2013). Outro trabalho relatou eficácia de 0% avaliada pelo teste de redução de ovos nas fezes em uma criação de ovinos na Holanda, relacionada ao helmintos do gênero *Haemonchus* (VAN DEN BROM et al., 2015).

Nos três trabalhos que já relataram a resistência do monepantel, sendo eles na Nova Zelândia, Uruguai e Holanda, ela ocorreu em um período de até 4 anos após o medicamento ser colocado no mercado (SCOTT et al., 2013; MEDEIROS et al, 2014; VAN DEN BROM et al., 2015), semelhante ao que ocorreu no Brasil. Este período é muito inferior ao que foi observado para as avermectinas,

anti-helmíntico amplamente utilizado no mundo. Gopal et al. (1999) fizeram o primeiro relato de resistência de ivermectina após aproximadamente dez anos de utilização na Nova Zelândia.

Em relação à quantificação de adultos de *Haemonchus contortus* foi possível diagnosticar uma ineficácia terapêutica da molécula monepantel na concentração de 2,5 mg Kg⁻¹ contra a espécie supracitada, sendo a de maior importância na ovinocultura mundial. Os resultados das necropsias parasitológicas nos possibilitaram inferir eficácia de terapêutica de 24,65% (médias aritméticas) podendo considerar a presença de resistência contra o composto monepantel 2,5% de acordo com as elevadas médias das contagens de exemplares de *Haemonchus contortus* presentes nos dois grupos (tabela 2). Um dos animais do grupo controle foi retirado uma vez que a contagem de ovos reduziu abruptamente a partir da quarta semana de patência. À necropsia, esse animal apresentou apenas 272 helmintos, justificando a retirada. Caso esse animal tivesse sido mantido, a eficácia observada para o produto seria de 7,31%.

O primeiro diagnosticado de resistência ao monepantel 2,5% com teste crítico (necropsia parasitológica) foi relado na Nova Zelândia em ovinos no qual o composto apresentou-se ineficaz, especialmente em relação a *Teladorsagia circumcincta* (0,0%) e *Trichostrongylus colubriformis* (9,0%). De forma curiosa, a eficácia contra o *Oesophagostomum venulosum* ficou também abaixo do esperado, com 48%. Ainda, foi demonstrada nenhuma eficácia contra *Capillaria* spp, *Trichuris* spp e *Strongyloides* spp, entretanto, até então não foi registrada atividade do monepantel contra estes parasitas (SCOTT et al., 2013).

No que diz respeito à resistência contra *Haemonchus contortus* na maioria dos municípios do estado São Paulo, o presente estudo corrobora com os resultados de resistência encontrados em outras classes de medicamento como oxfendazol, levamisol, ivermectina e moxidectina (AMARANTE et al., 1992; BUZZULINI et al., 2007).

É bastante registrada a informação de que não há parcimônia na utilização de anti-helmíntico em rebanhos ovinos nas propriedades rurais. Tal fato é reconhecido como agravante, justificando a ocorrência de resistência do presente estudo, uma vez que foi relatado pelo produtor a utilização continua com alta frequência de tratamentos em pequenos intervalos de tempo, colaborando para a seleção de populações resistentes.

Apesar da maioria dos estudos comprovarem a alta eficácia do monepantel 2,5% no teste de redução de contagens de ovos por grama de fezes (OPG) recomenda-se necessária a realização de outros estudos em outras estirpes com metodologias que incluam teste crítico *in vivo*, a fim de melhorar acurácia dos resultados de eficácia terapêutica do monepantel 2,5% nos nematódeos parasitos de ovinos.

CONCLUSÕES

A suspeita de ineficácia do monepantel foi confirmada na propriedade estudada, podendo estar associada a utilização do vermífugo de forma massiva. *Haemonchus contortus* mostrou capacidade de desenvolver resistência ao monepantel após poucas gerações, considerando que o anti-helmíntico havia sido utilizado na propriedade por um período de apenas um ano.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo auxílio financeiro para pesquisa e pela bolsa de estudos concedidos.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A.; OLIVEIRA, M. A. G.; CARMELLO, M. J.; PADOVANI, C. R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v.29, n.1, p.31-38. 1992.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals*. p. 1–102, 2013

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 48 de 12 de maio de 1997. *Diário Oficial (da) União*. Brasília, 12 de maio de 1997. Seção I, n.92, p. 10165-10169.

BUZZULINI, C.; SILVA-SOBRINHO, A. G.; COSTA, A. J.; SANTOS, T. R.; BORGES, F. A.; SOARES, V. E. Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação Albendazol, Levamisole e Ivermectina à Moxidectina em ovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n.6, p.891-895, 2007.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintc resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v.44, p.35- 44, 1992.

COSTA, A. J. *Diagnóstico laboratorial em Parasitologia. I. Helminologia*. FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP. 2013.

DOBSON, R. J.; SANGSTER, N. C.; BESIER, R. B.; WOODGATE, R. G. Geometric means provide a biased efficacy result when conducting a faecal egg count reduction test (FECRT). *Veterinary Parasitology*, v.161, p.162–167, 2009.

FLEMING, S. A.; CRAIG, T.; KAPLAN, R. M.; MILLER, J. E.; NAVARRE, C.; RINGS, M. Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.20, p.435–444, 2006.

GOPAL, R. M.; POMROY, W. E.; WEST, D. M. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectina. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p.781-786, 1999.

HOSKING, B. C.; KAMINSKY, R.; SAGER, H.; ROLFE, P. F.; SEEWALD, W. A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research*, v.106, p.529–532, 2010.

KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; WEBER, S.; WENGER, A.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; GOEBEL, T.; GAUVRY, N.; PAUTRAT, F.; SKRIPSKY, T.; FROELICH, O.; KOMOIN-OKA, C.; WESTLUND, B.; SLUDER, A.; MÄSER, P. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, v.452, p.176–180, 2008.

KAMINSKY, R.; BAPST, B.; STEIN, P. A.; STREHLAU, G. A.; ALLAN, B. A.; HOSKING, B. C.; ROLFE, P. F.; SAGER, H. Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multiresistant nematodes of sheep. *Parasitology Research*, v.109, p.19–23, 2011.

LECOVÁ, L.; STUHLÍKOVÁ, L.; PRCHAL, L.; SKÁLOVÁ, L. Monepantel: the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology*, v.141, p.1686–1698, 2014.

LEVINE, N. D. *Nematode parasites of domestic animals and of man*. Burgess, Minneapolis, 1968. 600p.

MEDEROS, A. E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G. E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & Vectors*, v.7, p.598, 2014.

PRICHARD, R. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, v. 54, p.259-268, 1994.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.1; p.99-102, 1950.

SANGSTER, N. C.; GILL, J. Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology Today*, v.15, p.141-146, 1999.

SCOTT, I.; POMROY, B.; PAUL, K.; GREG, S.; BARBARA, A.; MOSS, A: Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, v.198, p.166-171, 2013.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*.4. ed. Japan: Japan International Cooperation Agency, 1998, 143p.

VAN DEN BROM, R.; MOLL, L.; KAPPERT, C.; VELLEMA, P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Veterinary Parasitology*, v.209, 278-280, 2015.

VAN WYK, J. A.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*, v.119, p.277-306, 2004.

VAN WYK, J. A. Refugia - overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.68, p.55-67, 2001.

VERCRUYSSSE, J.; HOLDSWORTH, P.; LETONJA, T.; BARTH, D.; CONDER, G. e, HAMAMOT, K.; o OKANO, K. International harmonisation of Anthelmintic Efficacy Guidelines. *Veterinary Parasitology*, v.96; p.171-193, 2001.

VERCRUYSSSE, J.; HOLDSWORTH, P.; LETONJA, T.; CONDER, G.; HAMAMOTO, K.; OKANO, K.; REHBEIN, S. International harmonisation of anthelmintic efficacy guidelines (Part 2). *Veterinary Parasitology*, v.103, p.277-297, 2002.

WALLER, P. J. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, v.72, p.391-412, 1997.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; KASSAI, T.; MALONE JR, J. B.; PANKAVIC, J. A.; REINECKE, R. K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S. M.; VERCROYSSSE, J. 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*, v. 58, p. 181-213, 1995.

WOLSTENHOLME, A. J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R., SAMSONHIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, N. C. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, v.20, p.469–476, 2004.

Tabela 1. Percentuais de redução e de eficácia dos valores médios das contagens de ovos de nematódeos (Estrongilídeos) por grama de fezes (OPG) em ovinos dos grupos controle e tratado, nas datas pós-tratamento. Médias aritméticas. FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. 2015.

Dias pós-tratamento (DPT)	Grupos experimentais/Valores médios contagens de ovos de nematódeos (OPG)		Percentuais de redução (%)	Percentuais de eficácia (%)
	GI: Controle	GII: Monepantel 2,5%*		
Média ⁻¹	28925,00 ^{Aa}	2514,00 ^{Aa}	-	-
2	19850,00 ^{Aa}	2130,00 ^{Aa}	15,27	0,00
4	28900,00 ^{Aa}	2478,00 ^{Aa}	1,43	14,26
6	28950,00 ^{Aa}	2298,00 ^{Aa}	8,59	20,62
8	22125,00 ^{Aa}	2234,00 ^{Aa}	11,14	0,00
10	30600,00 ^{Aa}	2760,00 ^{Aa}	0,00	9,80
12	27125,00 ^{Aa}	3348,00 ^{Aa}	0,00	0,00
14	35225,00 ^{Aa}	2364,00 ^{Aa}	5,97	32,89

Tabela 2. Número médio de *Haemonchus contortus* recolhidos de ovinos pertencentes aos grupos controle e tratado; percentuais de eficácia. Médias aritméticas. FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. 2015.

Espécie de helminhos	Grupos experimentais/Número de médio de helminhos		Percentual de eficácia (%)
	GI: Controle	GII: Monepantel 2,5%*	
<i>Haemonchus contortus</i>	4186,75 ^A	3154,60 _A	24,65