



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUARIA
DEPARTAMENTO DE FISCALIZACAO DE INSUMOS PECUARIOS
COORDENACAO DE FISCALIZACAO DE PRODUTOS DE USO VETERINARIO

MINUTA

MINUTA Nº

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº....., DE DE 2017

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto no Decreto-Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969, no Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, e o que consta do Processo nº 21000.000063/2009 - que institui o Grupo de Trabalho para a revisão da Portaria Ministerial nº 48 de 12 de maio de 1997, resolve:

Art. 1º Aprovar Regulamento Técnico com os critérios e procedimentos para avaliação da eficácia, da segurança e da rotulagem de produtos antiparasitários de uso veterinário elaborados no país ou importados, para fins de registro, alteração de registro e renovação de registro.

CAPÍTULO I

DAS DEFINIÇÕES

Art. 2º Para efeito deste Regulamento considera-se:

- I - anticoccidianos: produtos farmacêuticos que se destinam ao tratamento ou profilaxia da coccidiose nos animais;
- II - anti-helmínticos: produtos farmacêuticos que se destinam ao tratamento das helmintoses nos animais;
- III - bernicidas: produtos farmacêuticos que se destinam ao tratamento da dermatobiose;
- IV - carrapaticidas: produtos farmacêuticos que se destinam ao tratamento das infestações por carrapatos nos animais;
- V - estudo controlado: ensaio que inclui um ou mais tratamentos experimentais e, pelo menos um tratamento controle, bem como critérios definidos para avaliar a intervenção em estudo e método não tendencioso para designar os animais aos tratamentos experimentais;
- VI - hemoparasiticidas: produtos farmacêuticos que se destinam ao tratamento das hemoparasitoses nos animais;
- VII - Limite Máximo de Resíduo (LMR): é a concentração máxima permitida do resíduo de um produto de uso veterinário no alimento de origem animal, que é legalmente permitida ou reconhecida como segura à saúde do consumidor;
- VIII - mata-bicheiras: produtos farmacêuticos que se destinam ao tratamento das infestações causadas por *Cochliomyia hominivorax* nos animais;
- IX - mosquicidas: produtos farmacêuticos que se destinam ao tratamento das infestações por moscas nos animais ou profilaxia das instalações;
- X - período de carência ou período de retirada: é o intervalo de tempo entre a suspensão da administração do produto veterinário até o momento em que os resíduos de relevância toxicológica, nas matrizes estudadas, sejam iguais ou inferiores aos LMRs estabelecidos;
- XI - piolhidas: produtos farmacêuticos que se destinam ao tratamento das infestações por piolhos nos animais;
- XII - pulgicidas: produtos farmacêuticos que se destinam ao tratamento das pulgas dos animais;
- XIII- resíduos de produtos veterinários: são as substâncias originais e seus metabólitos em qualquer porção comestível do produto animal; e
- XIV - sarnicidas: produtos farmacêuticos que se destinam ao tratamento das sarnas nos animais.

CAPÍTULO II

DO RELATÓRIO TÉCNICO

Art. 3º O relatório técnico, apresentado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA pela empresa proprietária do produto ou pelo seu representante legal no país, deve conter, além do exigido pelo Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, e demais atos normativos complementares, os seguintes estudos:

- I- Estudos de eficácia;
- II- Estudos de segurança; e
- III- Estudos para a Determinação do Período de Carência.

Seção I

Dos Estudos de Eficácia

Art. 4º A eficácia do produto antiparasitário de uso veterinário deve ser demonstrada através de estudos, na posologia recomendada, para todos os agentes etiológicos indicados na bula e em todas as espécies animais para as quais o produto é indicado, com exceção dos mata-bicheiras, conforme item 1.5 do Anexo I.

Parágrafo Único. O *caput* não se aplica aos produtos mata-bicheiras de uso tópico nas lesões. Neste caso, o experimento em uma espécie servirá como base de indicação para outras espécies susceptíveis

Art. 5º Os estudos de eficácia de um produto antiparasitário de uso veterinário devem ser conduzidos com populações de parasitos de ocorrência no território nacional, observadas as normas para utilização de animais em experimentos.

§ 1º Em caráter excepcional, quando o solicitante do registro comprovar a impossibilidade de realização dos estudos no Brasil, poderá ser aceito relatório de estudo conduzido em outro país.

§ 2º O MAPA estabelecerá os critérios para a comprovação da impossibilidade citada no § 1º .

§ 3º Salvo as exceções previstas no Anexo I, todos os estudos de eficácia devem adotar parâmetros que possibilitem o cumprimento de metodologia controlada, aleatória e, preferencialmente, duplo-cega.

Art. 6º O relatório dos estudos de eficácia do produto antiparasitário de uso veterinário deve conter informações pormenorizadas, abrangendo, no mínimo:

- I – Identificação do estudo;
- II - sumário;
- III - local de realização;
- IV - médico veterinário responsável;
- V - pesquisador principal;
- VI - patrocinador;
- VII - monitor do estudo que deve estar vinculado ao patrocinador;
- VIII - partida do produto utilizada;
- IX - descrição do método de criação e alimentação fornecida aos animais;
- X - características dos animais estudados;
- XI - origem e destino dos animais estudados;
- XII - delineamento experimental;
- XIII - análise estatística;
- XIV – resultados;
- XV – discussão; e
- XVI - conclusão.

Parágrafo Único. O estabelecimento detentor do registro do produto antiparasitário de uso veterinário deve manter em arquivo os dados brutos obtidos nos estudos, os quais devem estar disponíveis ao MAPA, pelo período de 10 (dez) anos.

Art. 7º Para o registro e licenciamento de produtos antiparasitários de uso veterinário são requeridos os seguintes níveis de eficácia:

§ 1º Para os produtos antiparasitários de uso veterinário com indicação contra miíases (bicheiras), metacestóides de tênias, dirofilariose e sarna, eficácia mínima de 90%;

§ 2º Para os produtos antiparasitários de uso veterinário com indicação babesicida, a eficácia mínima de 90% e para os demais hemoparasiticidas, de 80%.

§ 3º Para os demais produtos antiparasitários de uso veterinário, eficácia mínima de 80%.

Art. 8º. De acordo com os níveis de eficácia, o produto antiparasitário de uso veterinário será considerado:

- I – altamente eficaz: quando o nível de eficácia for maior ou igual 98%.
- II – eficaz: quando o nível de eficácia for maior ou igual a 90% e menor que 98%.
- III – moderadamente eficaz: quando o nível de eficácia for maior ou igual que 80% e menor que 90%.

Art. 9º O nível da eficácia do produto corresponde ao valor médio das porcentagens atingidas em cada estudo.

Parágrafo único. A porcentagem de cada estudo corresponde ao valor médio das porcentagens calculadas em cada momento no qual foi atingido o nível mínimo de eficácia.

Seção II

Dos estudos de segurança

Art. 10. A segurança do produto antiparasitário de uso veterinário deve ser avaliada por meio de exames clínicos e laboratoriais, para verificar se a administração do produto, na posologia recomendada, causa efeitos nocivos nos animais, além daqueles já previstos nos estudos toxicológicos do princípio ativo.

§ 1º A segurança do produto antiparasitário de uso veterinário deve ser demonstrada em estudos nas espécies animais para as quais o produto é indicado, considerando a categoria animal, quando couber;

§ 2º O tamanho da amostra utilizada nos estudos de segurança de produto antiparasitário de uso veterinário deve ser justificado estatisticamente ou por intermédio de referências internacionalmente reconhecidas;

§ 3º Todos os estudos de segurança devem adotar parâmetros que possibilitem o cumprimento de metodologia controlada, aleatória e preferencialmente duplo-cega.

Art. 11. Os estudos de segurança de produto antiparasitário de uso veterinário devem conter informações pormenorizadas, abrangendo, no mínimo:

I – Identificação do estudo;

II - sumário;

III - local de realização;

IV - médico veterinário responsável;

V - pesquisador principal;

VI - patrocinador;

VII - monitor do estudo que deve estar vinculado ao patrocinador;

VIII - partida do produto utilizada;

IX - descrição do método de criação e alimentação fornecida aos animais;

X - características dos animais estudados;

XI - origem e destino dos animais estudados;

XII - delineamento experimental;

XIII - análise estatística;

XIV – resultados;

XV – discussão; e

XVI - conclusão.

Parágrafo Único. O detentor do registro do produto antiparasitário de uso veterinário deve manter em arquivo os dados brutos obtidos nos ensaios, os quais devem estar disponíveis para o Mapa, pelo período de 10 anos.

Seção III

Dos Estudos para a Determinação do Período de Carência

Art. 12. O Período de Carência de produto antiparasitário de uso veterinário deve ser avaliado em estudo de depleção de resíduos realizado com a formulação pretendida do antiparasitário, nas espécies animais produtores de alimentos destinados ao consumo humano para as quais o produto é indicado, nas matrizes recomendadas, utilizando a maior posologia indicada.

§ 1º Para determinação do período de carência do produto antiparasitário de uso veterinário, são aceitos os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos pela Anvisa;

§ 2º O tamanho da amostra utilizada no estudo para a determinação do período de carência de produto antiparasitário de uso veterinário deve ser justificado estatisticamente ou por intermédio de referências internacionalmente reconhecidas;

§ 3º O período de carência do produto antiparasitário de uso veterinário deve ser calculado através de regressão que interpole a linha do limite máximo de resíduo no gráfico concentração do resíduo versus tempo, não sendo permitido cálculo por extrapolação.

Art. 13. Para produto já registrado no MAPA, quando o período de carência aprovado na ocasião do registro não garantir o LMR atual definido para a substância ativa, a empresa proprietária do produto ou seu representante legal no país deve solicitar alteração do registro do produto.

§ 1º Quando couber, a empresa deve refazer os cálculos.

§ 2º Quando os dados disponíveis não forem suficientes ou adequados, deve refazer os estudos de forma a determinar o novo período de carência do produto.

§ 3º O cumprimento do disposto no caput é opcional quando o LRM atual for maior que o utilizado para realização dos estudos na ocasião do registro.

Art. 14. Todos os dados do estudo relativos ao ensaio clínico e análises laboratoriais para a determinação do período de carência de produto antiparasitário de uso veterinário devem ser apresentados, contendo, no mínimo, as seguintes informações:

- I – Identificação do estudo;
- II – sumário;
- III - protocolo experimental;
- IV - local de realização;
- V - médico veterinário responsável;
- VI - pesquisador principal;
- VII – patrocinador;
- VIII - monitor do estudo vinculado ao patrocinador;
- IX - partida do produto utilizada;
- X - descrição do método de criação e alimentação fornecida aos animais;
- XI - características dos animais estudados;
- XII - origem e destino dos animais estudados;
- XIII - delineamento experimental;
- XIV - parâmetros avaliados;
- XV - análise estatística;
- XVI - resultados com o auxílio de tabelas, gráficos, relatório de validação analítica, laudos analíticos e cromatogramas;
- XV - discussão; e
- XVI - conclusão.

Parágrafo Único. O detentor do registro do antiparasitário de uso veterinário deve manter em arquivo os dados brutos obtidos nos estudos, os quais devem estar disponíveis ao Mapa, pelo período de 10 (dez) anos.

CAPÍTULO III

DA REALIZAÇÃO DE ESTUDOS

Art. 15. A realização dos estudos de eficácia, segurança e para a determinação do período de carência de produtos antiparasitários de uso veterinário para fins de registro ou alteração de registro deve ser comunicada ao Mapa em até trinta dias do seu início, com os seguintes dados:

- I - identificação do produto em investigação, incluindo a quantidade e a (s) partida (s) do produto;
- II - identificação e localização do centro clínico que realizará o (s) estudo (s);
- III - cronograma de atividades e data provável de início e término dos ensaios;
- IV - descrição resumida do protocolo experimental, devidamente aprovado pelo patrocinador e investigador;
- V - documento de aprovação do protocolo experimental pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) competente; e
- VI - quando se tratar de produto importado, a autorização de importação da (s) amostra (s) do produto antiparasitário de uso veterinário para fins de estudos para registro.

Parágrafo único. Quando não for possível a realização do estudo na data comunicada, o MAPA deve ser notificado devendo ser indicada a nova data para realização dos estudos.

CAPÍTULO IV

DA ROTULAGEM

Art. 16. A rotulagem dos produtos antiparasitários de uso veterinário deve atender ao que dispõe o Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, e, complementarmente, as disposições que se seguem, no que couber.

§ 1º A bula, cartucho-bula e rótulo bula deve indicar para cada parasito estudado, o nível de eficácia baseado no que determina o Art. 10, incluindo as seguintes expressões:

- I – para produtos altamente eficazes: “produto altamente eficaz” se o estudo apontar eficácia maior ou igual a 98% de eficácia;
- II - para produtos eficazes: “produto eficaz- maior ou igual a 90% e menor que 98% de eficácia; e

III - para produtos moderadamente eficazes: “produto moderadamente eficaz- maior ou igual a 80% e menor que 90% de eficácia;

§ 2º Devem constar do rótulo, cartucho ou invólucro as expressões “MODERADAMENTE EFICAZ”, “EFICAZ” ou “ALTAMENTE EFICAZ” de acordo com o nível de eficácia do produto baseado no que determina o Art. oitavo.

§ 3º As expressões a que se refere o parágrafo segundo devem estar destacadas com fonte em negrito, em caixa alta e maior que a fonte dos dizeres restante de rotulagem, excetuando-se o nome do produto.

§ 4º O cumprimento das determinações do parágrafo segundo não é obrigatório quando se tratar da rotulagem de ampolas e dos pequenos envases.

§ 5º Na comprovação de distintos níveis de eficácia para diferentes indicações deverá ser escolhida a expressão que caracteriza a menor porcentagem de nível de eficácia atingido ou todas as expressões que caracterizam os diferentes níveis de eficácia alcançados, a fim de compor a rotulagem.

§ 6º A indicação do produto deve mencionar o(s) gênero(s) e espécie(s) de cada parasito cuja eficácia foi demonstrada pelos testes do Anexo I acrescidas dos dizeres: "Este produto é indicado para populações sensíveis dos parasitos mencionados".

§ 7º Fica proibida a utilização da expressão "amplo espectro" e “longa ação” nas indicações e nome do produto;

§ 8º Os proprietários dos produtos já registrados no MAPA dispõem do prazo de 12 (doze) meses para atendimento das exigências contidas no caput do Art. 16 e seus parágrafos, nas partidas a serem fabricadas a partir de então.

CAPÍTULO V

DISPOSIÇÕES FINAIS

Art. 17. O produto antiparasitário de uso veterinário com associação de duas ou mais substancias antiparasitárias deve apresentar comprovada melhoria da eficácia, quando comparado ao uso isolado dos fármacos.

§ 1º O disposto no *caput* não se aplica a associação de duas ou mais substancias antiparasitárias para ampliação do espectro de ação antiparasitário cuja comprovação da eficácia pode ser realizada apenas com a formulação proposta.

§ 2º Nos casos de associação de fármacos antiparasitários, a demonstração da melhoria da eficácia ou ampliação do espectro deve ser efetuada utilizando-se metodologia contida no Anexo II ou em referências internacionalmente aceitas, para os casos não contemplados no referido anexo.

Art. 18. Não será permitido o registro de produtos antiparasitários de uso veterinário cuja fórmula contenha associação com substancias antimicrobianas, anti-inflamatórias, vacinas, vitaminas, aminoácidos, minerais e outros grupos de substancias desprovidos de ação antiparasitária.

§ 1º - Exclui-se da restrição de que trata o *caput*, a associação com anti-inflamatório ou antimicrobiano em produtos para uso auricular e associação com antimicrobiano em mata-bicheiras, desde que demonstrado por meio de estudos de eficácia a vantagem da inclusão da substância desprovida de ação antiparasitária.

§ 2º Para comprovação da vantagem a que se refere o parágrafo primeiro, admite-se a fabricação de lote de bancada para a formulação na qual foi suprimida a substância desprovida de ação parasitária.

Art. 19. Os detentores de registro de produtos antiparasitários de uso veterinário contendo associações de substancias antiparasitárias dispõem do prazo de até vinte e quatro meses, a contar da data de publicação deste Regulamento, para demonstrarem a melhoria da eficácia ou ampliação do espectro de ação da associação existente, para adequarem a fórmula do produto às exigências deste Regulamento.

Art. 20. Os detentores de registro de produtos antiparasitários de uso veterinário contendo associações mencionadas no caput do Artigo 18 dispõem do prazo de até trinta e seis meses, a contar da data da publicação deste Regulamento, para adequação de suas fórmulas mediante solicitação de alteração do registro.

Art. 21. A solicitação de registro ou alteração de registro de produto de uso veterinário que culmine no aumento da concentração de substância ativa, quando comparada com a de produto já registrado no MAPA, só será aprovada caso haja justificativa técnica amparada em dados científicos para o aumento da concentração mencionada.

Art. 22. Os estudos *in vivo*, na população alvo, para efeitos de comprovação de eficácia, poderão ser substituídos por estudos *in vitro* baseados em metodologia para o mesmo fim constante de guias internacionalmente reconhecidos.

Art. 23. Para produtos registrados no MAPA, deve-se proceder a realização de estudos para comprovação de eficácia em conformidade com o que determina o Anexo I no prazo de 05 (cinco) anos a partir da data de publicação desta Instrução Normativa.

Parágrafo único. Excetua-se das determinações contidas no *caput* os produtos de uso veterinário antiparasitários bernicidas, mata-bicheiras, mosquicidas para uso em instalações, iscas mosquicidas, piolhidas, sarnicidas, produtos contra metacestódeos de *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*), anti-helmíntico de aves canoras e ornamentais.

Art. 24 Ficam revogadas a Portaria nº 48 de 12 de maio de 1997 e a Portaria nº 301, de 19 de abril de 1996.

ANEXO I

Categoria do produto	Estudos obrigatórios para o registro	Estudos opcionais
Bernicidas	1. Estudo controlado com infestação natural; ou 2. Estudo controlado com infestação artificial	1. Estudo de constatação da persistência da eficácia bernicida

Carrapaticidas/pulicidas	<p>BOVINOS</p> <p>1. Estudo controlado com infestação artificial (teste de estábulo); e</p> <p>2. Estudo controlado com infestação natural (teste de campo)</p> <p>EQUÍDEOS</p> <p>1. Estudo controlado com infestação natural para a determinação da eficácia para <i>Amblyomma cajennense Sensu Lato</i> - estudo crítico; e/ou</p> <p>2. Estudo controlado com infestação artificial - teste de estábulo (<i>Dermacentor nitens</i>); e/ou</p> <p>3. Estudo controlado com infestação natural (<i>D. nitens</i>) (teste de campo)</p> <p>CANINOS/FELINOS</p> <p>1. Estudo controlado com infestação artificial para pulga e carrapatos; e</p> <p>2. Estudo controlado com infestação natural para pulgas e carrapatos;</p> <p>3. Estudo controlado de eficácia ovicida, larvicida e adulticida em pulgas (<i>apenas para produtos aplicados no ambiente</i>);</p>	<p>BOVINOS</p> <p>1. Estudo de constatação da persistência da eficácia carrapaticida;</p> <p>2. Estudo para determinação da viabilidade reprodutiva de teleóginas;</p> <p>EQUÍDEOS</p> <p>1. Estudo controlado com infestação natural para a determinação da persistência da eficácia carrapaticida no controle de <i>Amblyomma cajennense Sensu Lato</i>;</p> <p>2. Estudo de constatação da persistência da eficácia (<i>Dermacentor</i>);</p> <p>3. Estudo para determinação da viabilidade reprodutiva de teleóginas (<i>Dermacentor</i>)</p> <p>CANINOS/FELINOS</p> <p>1. Estudo de constatação da persistência da eficácia carrapaticida/pulicida;</p> <p>2. Determinação da interrupção do desenvolvimento de pulgas (ovo à adulto);</p>
Mata-bicheiras	<p>1. Estudo controlado com infestação artificial em feridas induzidas; ou</p> <p>2. Estudo controlado com infestação natural em feridas induzidas; ou</p> <p>3. Estudo controlado com infestação natural sem indução de feridas</p>	<p>1. Estudo controlado para avaliação da repelência de mata-bicheiras</p>
Mosquicidas	<p>1. Estudo controlado em instalações rurais;</p> <p>2. Estudo controlado para iscas mosquicidas;</p> <p>3. Estudo controlado mosquicida para produto sobre os animais</p>	<p>1. Estudo de constatação da persistência da eficácia</p>
Piolhidas	<p>Estudos controlado de eficácia para produtos piolhidas</p>	
Sarnicidas	<p>Estudo controlado de eficácia para produto sarnicida</p>	
Anti-helmínticos	<p>RUMINANTES</p> <p>1. Estudo controlado com infecção artificial ou natural; e</p> <p>2. Estudo com infecção natural a campo</p>	<p>RUMINANTES</p> <p>1. Estudo contra larvas inibidas (Tipo II) de <i>Ostertagia spp.</i>;</p> <p>2. Estudo contra nematódeos resistentes (teste controlado com infecção artificial e estudo controlado com infecção natural de campo);</p> <p>3. Estudo controlado contra cestódeos;</p> <p>4. Estudo de eficácia contra metacestódeos de <i>T. saginata (Cysticercus bovis)</i>;</p>

	<p>EQUÍDEOS</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estudo controlado com infecção artificial; ou 2. Estudo controlado com infecção natural (estudo crítico); ou 3. Estudo controlado para cestódeos com infecção natural (estudo crítico); <p>SUÍNOS</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estudo controlado com infecção natural e necropsia; e 2. Estudo com infecção natural e OPG <p>AVES PRODUTORAS DE ALIMENTOS</p> <p>Estudo Controlado de Eficácia Anti-helmíntica em Aves Produtoras de Alimento Destinado ao Consumo Humano</p> <p>AVES CANORAS E ORNAMENTAIS</p> <p>Estudo Controlado de Eficácia Anti-helmíntica em Aves Canoras e Ornamentais</p> <p>CANINOS E FELINOS</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estudo controlado com infecção artificial ou natural; ou 2. Estudo controlado com infecção natural – estudo crítico; ou 3. Estudo controlado substitutivo de eficácia de anti-helmínticos para cães e gatos 	<p>5. Estudos contra trematódeos (estudos com infecção induzida e estudos com infecção natural);</p> <p>CANINOS E FELINOS</p> <p>Estudo controlado de eficácia preventiva para o verme do coração (<i>Dirofilaria immitis</i>)</p>
Anti-coccidianos	ESTUDO CONTROLADO PARA ANTI-COCCIDIANOS (EFICÁCIA PREVENTIVA) EM AVES	
Hemoparasitoidas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Estudo controlado para Avaliação da eficácia Babesicida em Bovinos 2. Estudo controlado para avaliação da eficácia Anaplasmicida em Bovinos 3. Estudo controlado para avaliação da eficácia Babesicida e Theilericida em equídeos 4. Estudo controlado para avaliação da eficácia Babesicida e Anaplasmicida em caninos 5. Estudo controlado de eficácia para <i>Trypanosoma evansi</i> 6. Estudo controlado de eficácia para <i>Trypanosoma vivax</i> 	
Giardicida	Estudo controlado para a avaliação da eficácia giardicida em cães e gatos	
Isospora	ESTUDO CONTROLADO DE EFICÁCIA PARA <i>Isospora sp.</i> EM SUÍNOS	

ANEXO II

ESTUDOS DE EFICÁCIA

1. Ectoparasitícidias

1.1. Estudos de Eficácia para Bernicidas em Bovinos

A eficácia bernicida deve ser demonstrada por meio de estudos controlados com infestações artificiais ou testes de campo com infestações naturais.

Independentemente do método de infestação adotado, a eficácia bernicida será determinada comparando-se a mortalidade ou expulsão das larvas em período entre 7 (sete) a 14 (quatorze) dias após o tratamento. No caso da necessidade da constatação da persistência da eficácia bernicida, contagens de larvas vivas deverão ser realizadas a cada sete dias pelo tempo desejado.

A eficácia da persistência deverá ser calculada subtraindo-se do período em que foi observado o nível de eficácia mínimo de 80%, o valor de 35 dias, que corresponde ao período de pré-patência para as larvas em bovinos.

1.1.1 - Estudo de controlado com infestação natural

Um mínimo de 20 bovinos infestados com larvas de *Dermatobia hominis* devem ser selecionados. Antes do tratamento, o número de larvas em todo o corpo do animal deve ser registrado e representado graficamente com precisão num desenho com formato de bovino. Os 2 animais com a contagem mais elevada devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle (não tratado) e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 10 animais. Após o tratamento os animais deverão ser mantidos em pastagens distintas.

A eficácia bernicida será calculada através da fórmula: **[(média aritmética de larvas vivas nos animais do grupo controle - média aritmética de larvas vivas nos animais do grupo tratado) ÷ (média aritmética de larvas vivas nos animais do grupo controle)] x 100.**

1.1.2 - Estudo controlado com infestação artificial

Um mínimo de 6 bovinos deve ser infestado, individualmente com 25 larvas de primeiro instar de *D. hominis*. Outros 6 bovinos, infestados de modo similar, sem tratamento, serão considerados como grupo controle. Após 12 a 16 dias da infestação e antes do tratamento, o número de larvas em todo o corpo de todos os animais deve ser registrado e representado graficamente com precisão em desenho com formato de bovino. Os dois animais com a contagem mais elevada devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle (não tratado) e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 6 animais. No caso de estudos que visem a avaliação da persistência da ação, infestações deverão ser realizadas a cada sete dias. Durante todo o período experimental os animais deverão ficar estabulados individualmente em ambiente telado.

A eficácia bernicida deverá ser calculada através da fórmula: **(média aritmética de larvas vivas nos animais do grupo controle - média aritmética de larvas vivas nos animais do grupo tratado) ÷ (média aritmética de larvas vivas nos animais do grupo controle) x 100.**

1.2. Estudo de Eficácia para Carrapaticidas em Bovinos

No caso de produtos que apresentem grupamentos químicos diferentes dos convencionais (piretróides, organofosforados, carbamatos, amidinas) em sua fórmula, deve-se apresentar protocolo específico com base em publicações científicas e ou experimentações prévias. Produtos não convencionais, que necessitem de períodos superiores a 4 dias após o tratamento para atingir os níveis aceitáveis de eficácia, além das justificativas técnicas pertinentes, devem estabelecer claramente o período que após o tratamento atingem os níveis mínimos estabelecidos de eficácia para registro.

1.2.1 - Estudo controlado com infestação artificial (teste de estábulo)

A unidade experimental deve ser constituída de no mínimo 6 (seis) bovinos por tratamento. Durante todo o período experimental os animais devem ficar estabulados individualmente. Cada um dos animais deve ser infestado com 2.500 a 5.000 larvas (idade entre 7 a 21 dias, de uma estirpe identificada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, em no mínimo 12 ocasiões (entre os dias -25 a -1). Sugerem-se os seguintes intervalos: nos dias: -25; -23, -21, -19, -17, -15, -11, -9, -7, -5, -3, -1, considerando-se o dia 0 (zero) como o dia do tratamento.

Coletas totais de carrapatos desprendidos do corpo dos animais devem ser efetuadas, diariamente, a partir do dia -3 até o dia +23 do ensaio. Para efeito de alocação, os animais devem ser listados em ordem decrescente, de acordo com a média aritmética das contagens de teleóginas colhidas nos dias -3, -2, -1 antes do tratamento. O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com as contagens mais elevadas devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 6 animais. Para o cálculo da eficácia do tratamento deve se comparar as médias dos números de teleóginas recuperadas dos animais medicados, com as medias observadas nos animais controle. Para tanto, deve ser empregada a seguinte fórmula:

$$[1 - (Ta \times Cb) \div (Tb \times Ca)] \times 100$$

Onde:

Ta = média aritmética de teleóginas recuperadas dos animais tratados, após a medicação (dias +1 a +23);

Tb = média aritmética de teleóginas recuperadas dos animais tratados nos 3 dias anteriores ao tratamento;

Ca = média aritmética de teleóginas recuperadas dos animais controle no período pós-tratamento (dias +1 a +23);

Cb = média aritmética de teleóginas recuperadas dos animais controles nos 3 dias anteriores ao dia do tratamento.

Dados relacionados à eficácia diária do produto em teste também devem ser reportados. Para tanto, recomenda-se a adoção da equação anterior e o emprego de dados diários, após a data do tratamento, com relação ao número médio de teleóginas recolhidas do grupo controle e do grupo medicado (Ca e Ta), para os dias =+1 a +23.

Para a determinação da eficácia do tratamento na viabilidade reprodutiva de teleóginas de *R. microplus*, deve ser empregada a seguinte fórmula: **% de inibição de reprodução = (índice de reprodução do grupo testemunha - índice de reprodução do grupo tratado) ÷ (índice de reprodução do grupo testemunha) x 100, sendo o índice de reprodução = (média do peso da massa de ovos ÷ média do peso das teleóginas) x (% de eclosão dos ovos) x 20.000.**

Recomenda-se utilizar entre 10 e 20 teleóginas por dia, por tratamento, quando disponíveis. Este procedimento experimental é opcional e somente deve ser realizado nos casos onde há interesse em indicar o produto para a inibição da reprodução de teleóginas.

1.2.2 - Estudo de constatação da persistência da eficácia carrapaticida

A partir do dia +7 após o tratamento, todos os animais, devem ser infestados, individualmente com no mínimo cinco mil larvas em intervalos semanais. O ensaio poderá ser encerrado quando a eficácia média for inferior a 80%. A determinação dos níveis de eficácia deve ser calculada empregando-se as médias recuperadas de teleóginas desprendidas de ambos os grupos nos períodos entre 18 a 24 dias após cada reinfestação. Desta forma a indicação do período residual de proteção para reinfestação deverá ser expresso em intervalos semanais, ou seja, 7 dias, 14 dias, 21 dias, etc.

A eficácia será calculada através da fórmula: **[(média aritmética de carrapatos \geq 4,5mm vivos nos animais do grupo controle - média aritmética de carrapatos \geq 4,5mm vivos do grupo tratado) ÷ (média aritmética de carrapatos \geq 4,5mm vivos do grupo controle)] x 100.**

1.2.3 - Estudo controlado com infestação natural (teste de campo)

Deve ser feito um registro histórico da propriedade que sediou o experimento, no que se refere à sua localização, tipo de exploração, estimativa das populações bovina e de outros animais domésticos, bem como a descrição de antecedentes de uso e problemas com carrapaticidas, descrevendo-se o tipo e a qualidade das instalações. Os animais devem ser identificados antecipadamente e após o tratamento os animais deverão ficar em pastagens separadas.

No mínimo 10 animais em um grupo tratado e outros 10 animais em um grupo controle devem ser utilizados. Ao critério do investigador, a contagem de carrapatos com tamanho \geq 4,5mm poderá ser realizada apenas de um lado ou em todo o corpo do animal. Deverão ser realizadas no mínimo duas contagens pré-tratamento entre os dias -7 e 0 (dia do tratamento). As médias destas contagens pré-tratamento serão utilizadas para o ranqueamento dos animais nos grupos experimentais. Os dois animais com as médias aritméticas mais elevadas devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle (não tratado) e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 10 animais.

A eficácia do tratamento será calculada a partir do dia + 7 e em intervalos semanais, no mínimo até o dia +21.

No caso da necessidade da constatação da persistência da eficácia carrapaticida, contagens deverão ser realizadas a cada sete dias pelo tempo necessário.

A eficácia da persistência deverá ser calculada subtraindo-se do período em que foi observado o nível de eficácia mínimo de 80%, o valor de 21 (dias de pré-patência).

A eficácia carrapaticida do tratamento será calculada para cada tomada de tempo experimental com a fórmula: **[(média aritmética de carrapatos \geq 4,5mm vivos nos animais do grupo controle - média aritmética de carrapatos \geq 4,5mm vivos do grupo tratado) ÷ (média aritmética de carrapatos \geq 4,5mm vivos do grupo controle)] x 100.**

Para formulações de uso em banho de imersão, deve-se estimar a exaustão do produto e testar as propriedades físico-químicas do preparado ao longo do tempo, após a diluição, armazenamento e uso do preparado. Identificar e descrever as respostas toxicológicas dos animais frente ao preparado e em especial de animais jovens. Para os produtos destinados ao uso em banheiros de imersão o experimento deverá ter a duração mínima de um ano, e serem empregados no mínimo 2.500 bovinos. As indicações de reforço ou recargas deverão vir acompanhadas das respectivas análises do princípio ativo.

1.3- Estudos de Eficácia para Carrapaticidas em Equídeos

São dois os carrapatos de equídeos que podem ser avaliados quanto a ação de carrapaticidas, *Amblyomma cajennense Sensu Lato* e *Dermacentor nitens*.

No caso de produtos que apresentem grupamentos químicos diferentes dos convencionais (piretróides, organofosforados, carbamatos, amidinas) em sua fórmula, deve-se apresentar protocolo específico com base em publicações científicas e ou experimentações prévias. Produtos não convencionais, que necessitem de períodos superiores a 4 (quatro) dias após o tratamento para atingir os níveis aceitáveis de eficácia, além das justificativas técnicas pertinentes, devem estabelecer claramente o período que após o tratamento atingem os níveis mínimos de eficácia estabelecidos para registro.

1.3.1 - Estudo de controlado com infestação natural para a determinação da eficácia para *Amblyomma cajennense Sensu Lato* - estudo crítico

Deverão ser utilizados animais infestados naturalmente. Deve ser considerada a avaliação apenas contra partenóginas e teleóginas, empregando-se a avaliação crítica em que cada animal é seu próprio controle. Larvas e ninfas podem ser empregadas para avaliação, desde que justificadas. Deve-se incluir no mínimo 10 (dez) equinos, podendo ser efetuada com diversas repetições, desde que seja efetuada na mesma propriedade ou instituição de pesquisa, pelos mesmos investigadores, no prazo de até 60 dias. Todos os carrapatos adultos (machos e fêmeas) de *A. cajennense* devem ser registrados no dia -1 e nos dias +2 e +4 após o tratamento. O segundo tratamento com o mesmo produto, caso necessário, usando a mesma dose e forma de aplicação pode ser repetido no dia +7, sendo então efetuada nova contagem de carrapatos no dia +10 da data do primeiro tratamento.

A média da contagem pré-tratamento será utilizada para o ranqueamento dos animais nos grupos experimentais. Os dois animais com as médias aritméticas mais elevadas devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle (não tratado) e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 10 animais. Os animais após o tratamento devem ser mantidos em pastagens separadas.

Para efeito de cálculo da eficácia carrapaticida será empregada a seguinte equação: **eficácia = [(média aritmética de carrapatos vivos antes do tratamento) x (média aritmética de carrapatos de carrapatos vivos após o tratamento / média aritmética de carrapatos vivos antes do**

tratamento)] x 100.

1.3.2 - Estudo de controlado com infestação natural para a determinação da persistência da eficácia carrapaticida no controle de *Amblyomma cajennense* Sensu Lato em equídeos

Na avaliação da eficácia residual ou persistência de proteção à reinfestação por *A. cajennense* Sensu Lato em equinos, devem ser utilizados 10 animais no grupo controle e 10 animais no grupo tratado, sendo as contagens de carrapatos (necessariamente partenóginas e teleóginas). Larvas e ninfas podem ser também empregadas para a avaliação, desde que justificadas. Contagens devem ser efetuadas em ambos os grupos, no dia -1 e a cada 7 (sete) dias após a data do tratamento pelo tempo que seja desejável para a determinação da persistência da eficácia.

A média da contagem pré-tratamento será utilizada para o ranqueamento dos animais nos grupos experimentais. Os dois animais com as médias aritméticas mais elevadas devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle (não tratado) e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 10 animais.

Para efeito de cálculo da eficácia carrapaticida será empregada a seguinte equação: $\text{eficácia} = \frac{[(\text{média aritmética de carrapatos vivos do grupo controle}) \times (\text{média aritmética de carrapatos de carrapatos vivos do grupo medicado}) / (\text{média aritmética de carrapatos vivos antes do grupo controle})] \times 100}{100}$.

1.3.3 - Estudo de eficácia carrapaticida para o controle de *Dermacentor nitens* em equídeos

1.3.3.1 - Estudo controlado de estábulo com infestação artificial (teste de estábulo)

A unidade experimental deverá ser constituída de no mínimo seis equinos por grupo, controle e tratado. Os animais deverão ser mantidos estabelecidos individualmente por todo o período experimental. Os animais devem ser infestados com 1.500 a 3.000 larvas de uma estirpe identificada de *D. nitens*, com idade entre 7 a 21 dias, no mínimo em 11 ocasiões entre os dias -32 a -2, sugere-se os seguintes intervalos: nos dias: -32, -29, -26, -23, -20, -17, -14, -11, -8, -5, -2, considerando-se o dia 0 (zero) como o dia do tratamento. Coletas totais de carrapatos desprendidos do corpo dos animais deverão ser efetuadas a partir do dia -3 até o dia +32 do ensaio. Coletas totais de carrapatos desprendidos do corpo dos animais devem ser efetuadas, diariamente, a partir do dia -3 até o dia +32 do ensaio. Para efeito de alocação, os animais devem ser listados em ordem decrescente, de acordo com a média aritmética das contagens de teleóginas colhidas nos dias -3, -2, -1 antes do tratamento. O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com as contagens mais elevadas devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 6 (seis) animais.

Para o cálculo da eficácia do tratamento deve se comparar as médias dos números de teleóginas recuperadas dos animais medicados, com os animais controle. Para tanto, pode se empregar a seguinte fórmula:

$$[1 - (T_a \times C_b) \div (T_b \times C_a)] \times 100$$

Onde:

T_a = média aritmética de teleóginas recuperadas dos animais tratados, após a medicação (dias +1 a +32);

T_b = média aritmética de teleóginas recuperadas dos animais tratados nos 3 dias anteriores ao tratamento;

C_a = média aritmética de teleóginas recuperadas dos animais controle no período pós-tratamento (dias +1 a +32);

C_b = média aritmética de teleóginas recuperadas dos animais controles nos 3 dias anteriores ao dia do tratamento.

Dados relacionados à eficácia diária do produto em teste também devem ser reportados. Para tanto, recomenda-se a adoção da equação anterior e o emprego de dados diários, após a data do tratamento, com relação ao número médio de teleóginas recolhidas do grupo controle e do grupo medicado (C_a e T_a), para os dias =+1 a +32.

1.3.3.2 - Estudo de constatação da persistência da eficácia (Dermacentor)

Na avaliação da eficácia residual ou persistência de proteção à reinfestação por *Dermacentor nitens* em equinos, devem ser utilizados 10 animais no grupo controle e 10 animais no grupo tratado, sendo as contagens de carrapatos (necessariamente partenóginas e teleóginas). Larvas e ninfas podem ser também empregadas para a avaliação, desde que justificadas. Contagens devem ser efetuadas em ambos os grupos, no dia -1 e a cada 7 (sete) dias após a data do tratamento pelo tempo que seja desejável para a determinação da persistência da eficácia.

1.3.3.3 - Estudo para determinação da viabilidade reprodutiva de teleóginas (Dermacentor)

Para a determinação da eficácia do tratamento na viabilidade reprodutiva de teleóginas de *Dermacentor nitens*, deve ser empregada a seguinte fórmula: $\% \text{ de inibição de reprodução} = \frac{(\text{índice de reprodução do grupo testemunha} - \text{índice de reprodução do grupo tratado}) \div (\text{índice de reprodução do grupo testemunha}) \times 100}{100}$, sendo o $\text{índice de reprodução} = \frac{(\text{média do peso da massa de ovos} \div \text{média do peso das teleóginas}) \times (\% \text{ de eclosão dos ovos})}{100}$.

Recomenda-se utilizar entre 10 e 20 teleóginas por dia, por tratamento, quando disponíveis. Este procedimento experimental é opcional e somente deve ser realizado nos casos onde há interesse em indicar o produto para a inibição da reprodução de teleóginas.

1.3.3.4 - Estudo controlado com infestação natural (teste de campo)

Os estudos têm como objetivo quantificar a eficácia do carrapaticida nas condições de campo. O interessado deve indicar o tipo de estirpe (sensível/resistente) que foi confrontada com o seu produto, assim como a dose e o modo de aplicação.

No mínimo 10 (dez) animais em um grupo tratado e outros 10 (dez) animais em um grupo controle devem ser utilizados para a contagem de partenóginas e teleóginas com tamanho igual ou superior a 4,5 mm antes e depois do tratamento. As contagens devem ser efetuadas por todo o corpo do animal incluindo o interior das fossas nasais. Atenção especial deve ser dada para as regiões das orelhas, inguinais, inserção da crina e da cauda e fossas nasais. Para efeito do ranqueamento, os 2 (dois) animais com as médias das contagens (pré-tratamento) mais elevadas devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 10 (dez) animais. Os animais de ambos os grupos devem ser mantidos em pastagem.

Deverão ser realizadas no mínimo duas contagens pré-tratamento entre os dias -7 e 0 (dia do tratamento) e nos dias +7, +14, +21, +28 e + 35 (após o tratamento). O ensaio pode ser encerrado quando o nível de eficácia for inferior a 80%. No caso da necessidade da constatação da persistência da eficácia carrapaticida, contagens deverão ser realizadas a cada sete dias pelo tempo necessário. A eficácia da persistência deverá ser calculada subtraindo-se do período em que foi observado o nível de eficácia mínimo de 80%, o valor de 32 (dias de pré-patência).

A eficácia será calculada por meio da equação: $[(\text{média aritmética de carrapatos} \geq 4,5\text{mm vivos nos animais do grupo controle} - \text{média aritmética de carrapatos} \geq 4,5\text{mm vivos do grupo tratado}) \div (\text{média aritmética de carrapatos} \geq 4,5\text{mm vivos do grupo controle})] \times 100$

1.4. Estudos de Eficácia para Pulguicidas e Carrapaticidas em Cães e Gatos

Recomenda-se a utilização de pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis*, que prevalece em cães e gatos no Brasil, assim como o do carrapato *Rhipicephalus sanguineus Senso Lato* para o cão. Os ensaios podem envolver mais de um ectoparasito por repetição, ou serem específicos para pulgas ou carrapatos. Quando no mesmo estudo forem ser avaliados ambos os parasitos o procedimento para o ranqueamento deverá ser baseado nas contagens de carrapato. Outras espécies de pulgas e carrapatos poderão ser empregadas desde que seja devidamente justificado e que sejam de relevância no Brasil.

1.4.1 - Teste controlado com infestação artificial

A unidade experimental deverá ser constituída de no mínimo 6 (seis) cães ou gatos, livres de parasitoses, por tratamento. Nos dias dos desafios os animais devem ser inspecionados e desparasitados para possíveis infestações de pulga e carrapato. Os animais devem ser infestados utilizando, no mínimo ± 100 pulgas (± 50 espécimes de machos e ± 50 fêmeas), recém emergidas e não alimentadas de colônia mantida em gatos ou cães. Não devem ser empregadas pulgas mantidas em sistema de alimentação artificial. Uma quantidade de ± 50 carrapatos (± 25 de machos e ± 25 fêmeas) adultos e não alimentados, com idade entre 7 e 21 dias, devem ser empregados nas infestações, não impedindo, porém ensaios específicos para avaliação da eficácia contra estágio de larva ou ninfa. Os animais devem ser penteados com pente fino com aproximadamente 11 a 13 dentes por cm, de forma a cobrir toda a superfície o corpo. O número de pulgas presentes pode ser registrado no momento da avaliação, porém é recomendada sua retirada e conservação em álcool 70°. A escovação de cada animal deve ser finalizada somente após 5 (cinco) minutos do registro da última pulga.

Nas infestações por carrapatos, recomenda-se localizar, pelo auxílio do tato manual, os carrapatos fixados à pele. Para tanto, se deve empregar luva descartável, trocada após o exame e manipulação de cada animal. Os carrapatos podem ser removidos com pente fino ou com o auxílio de pinça. As orelhas, espaços interdigitais, ou seja, todo o corpo deve ser examinado detalhadamente. Em estudos conjuntos de pulga e carrapato a avaliação deste deve preceder o de pulga.

O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem (pré-tratamento) mais elevadas de parasitos devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 6 animais. A infestação para o procedimento do ranqueamento deverá ser realizada no dia -7 e a avaliação no dia -5.

As avaliações para efeito da determinação da eficácia do produto deverão ser efetuadas entre 24 e 48 horas após o tratamento, ou em intervalo distinto conforme justificativa a ser apresentada pelo fabricante. A eficácia o produto no controle de infestações por pulgas e carrapatos será determinada pelo emprego da equação: **Eficácia carrapaticida ou pulguicida = (média aritmética de carrapatos/pulgas vivas nos animais do grupo controle – média aritmética de carrapatos/pulgas vivas nos animais do grupo tratado) ÷ (média aritmética de carrapatos/pulgas vivas nos animais do grupo controle) x 100.**

Para efeito de determinação da eficácia residual o produto em estudo, deve se estipular no protocolo os intervalos de interesse. Entretanto, para efeito de inclusão em bula, os intervalos mínimos serão de 7 dias, e as infestações e avaliações realizadas conforme descritas anteriormente.

1.4.2 - Estudo controlado com infestação natural (teste de campo)

Estudos de campo devem ser conduzidos com no mínimo 30 cães por estudo. Os estudos devem ser realizados com animais domiciliados. Contagens de pulgas/carrapatos vivos deverão ser realizadas em pelo menos duas ocasiões (datas) pré-tratamento para efeito de comparação com as contagens pós-tratamento. Após o tratamento avaliações poderão ser realizadas no mínimo a intervalos de sete dias. Para a contagem de pulgas os animais devem ser penteados com pente fino com aproximadamente 11 a 13 dentes por cm, de forma a cobrir toda a superfície o corpo. O número de pulgas presentes pode ser registrado no momento da avaliação, porém é recomendada sua conservação em álcool 70°. A escovação de cada animal deve ser finalizada somente após 5 (cinco) minutos do registro da última pulga. Nas contagens de carrapatos, recomenda-se localizar, pelo auxílio do tato manual, os carrapatos fixados à pele. Para tanto, se deve empregar luva descartável, trocada após o exame e manipulação de cada animal. Os carrapatos podem ser removidos com pente fino ou com o auxílio de pinça. As orelhas, espaços interdigitais, ou seja, todo o corpo deve ser examinado detalhadamente.

A eficácia o produto no controle de infestações por pulgas e carrapatos será determinada pelo emprego da equação: **Eficácia carrapaticida ou pulguicida = (média aritmética de carrapatos/pulgas vivas antes do tratamento – média aritmética de carrapatos/pulgas vivas nos animais depois do tratamento) ÷ (média aritmética de carrapatos/pulgas vivas nos animais antes do tratamento) x 100.**

Não devem ser utilizados mais do que 4 animais por propriedade. Em caso da presença de um número maior de animais, os outros deverão ser tratados com o produto em teste, mas não entraram com computo final do estudo.

1.4.3 - Estudo controlado para determinação da interrupção do desenvolvimento pulga (ovo à adulto)

Este tipo de ensaio é empregado principalmente para a avaliação de produtos que contenham na sua composição a categoria de fármacos reguladores de crescimento de artrópodes, e visa possibilitar a determinação da eficácia na interrupção do ciclo evolutivo da fase de ovo ao adulto. Deverão ser tratados no mínimo 6 animais (cães ou gatos) medicados e outros 6 animais deverão ser mantidos como controle (sem tratamento).

O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem (pré-tratamento dia -5) mais elevadas de parasito devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 6 animais.

Os animais deverão ser infestados com o mínimo de 200 pulgas, mantida uma proporção \pm de 1/3 de machos e \pm 2/3 de fêmeas. As infestações deverão ser realizadas nos dias +1 e a cada 7 dias após o tratamento. Após 72 horas de cada infestação os animais deverão ser colocados individualmente em caixas de transporte (ou similar) e mantidos por 2 a 4 horas. Após este período, os animais deverão ser retirados das caixas e ovos caídos no chão das caixas deverão ser coletados (antes de retirar os animais, o pelo poderá ser movimentado para possibilitar a maior queda de ovos). Alternativamente os animais poderão ser mantidos em canis e os ovos coletados do chão. Todos os ovos coletados de cada caixa, deverão ser

incubados individualmente, em placas de Petri ou tubos de ensaio e acondicionados em estufas climatizadas, em temperatura e umidade adequadas, por no mínimo 28 dias. Alternativamente poderá ser empregado um número que não o total de ovos recolhidos. Após este período, deverá ser analisado o número de pulgas adultas emergidas dos pupários presentes em cada material.

Para o cálculo de eficácia utilizar a fórmula que se segue: **% de inibição de ovo a adulto = (média aritmética do % de pulgas emergidas no grupo controle - média aritmética do % de pulgas emergidas no grupo tratado) ÷ (média aritmética do % de pulgas emergidas no grupo controle) x 100.**

1.4.4 - Estudo controlado de eficácia ovocida, larvicida e adulticida (para produtos de controle ambiental) de pulgas.

Números idênticos de ovos colhidos recentemente, larvas, pupas ou adultos, poderão ser submetidos a avaliação in vitro para a determinação da eficácia de produtos que tenham como indicação a aplicação ambiental para o controle das formas evolutivas presentes no ambiente como ovos, larvas, pupas e adultos. As formas evolutivas de interesse, ou alvo a serem investigadas, deverão ser submetidas, expostas a papéis de filtro impregnadas com o produto em teste. No mínimo seis repetições contendo no mínimo 10 espécimes de cada fase evolutiva deverão ser empregados. Da mesma forma deverá ser utilizado um grupo controle (não medicado). Os papéis impregnados (grupo tratado) e os pertencentes aos não tratados (grupo controle) deverão ser mantidos alojados dentro de tubos de ensaio ou placas de petri descartáveis. As repetições deverão ser mantidas em estufa climatizada em temperatura de 27°C e umidade relativa de 80%, após a inclusão das fases evolutivas. A avaliação da eclosão dos ovos deverá ser realizada após 72 horas. A avaliação das larvas será efetuada após 48h. A avaliação da eficácia adulticida poderá ser realizada em até 48 horas. Se a intenção for determinar a inibição do desenvolvimento de ovo a adulto, o material incubado deverá ser ovo. Os ovos deverão ser incubados junto com dieta específica para as larvas. O material deverá ser mantido em estufa climatizada com temperatura e umidade adequadas por um período mínimo de 28 dias, quando o material será avaliado quanto da emergência de adultos.

A eficácia deverá ser determinada para cada fase evolutiva com a seguinte fórmula: **[(média aritmética de parasito (ovo ou larva ou adulto) do grupo controle) - (média aritmética de parasito (ovo ou larva ou adulto) do grupo tratado) ÷ (média aritmética de parasito (ovo ou larva ou adulto) do grupo controle) x 100].**

1.5. Estudos de Eficácia Contra Míases por *Cochliomyia hominivorax*.

Pode ser demonstrada por meio de infestação em feridas induzidas (experimentais ou naturais) ou ainda em testes com infestações naturais sem feridas induzidas. A comprovação da repelência não é obrigatória e deve ser avaliada em estudo específico.

1.5.1 - Estudos controlado com infestação artificial em feridas induzidas

Deve-se utilizar no mínimo 6 animais com uma míase induzida artificialmente. A míase deve ser estabelecida por meio de incisão cutânea de aproximadamente 4 centímetros de diâmetro, seguida pela infestação de cada ferida com 50 larvas de 1^o instar de *Cochliomyia hominivorax*. O procedimento deve ser realizado sob anestesia local e com os animais sedados. Paralelamente, 3 animais infestados sob as mesmas condições deverão ser mantidos como grupo controle. Até 2 dias após a infestação, de acordo com o desenvolvimento das lesões, o produto deve ser administrado.

Deve-se proceder com o exame dos animais após 24 e 48 horas da aplicação e os resultados registrados, quanto a presença ou não de larvas vivas. É permitida a limpeza das feridas. No caso da presença de larvas vivas, 48 horas após a primeira administração, permite-se a reaplicação do produto tópico (de aplicação sobre as feridas) apenas nas feridas positivas. Em tratamentos parenterais ou tópicos (pour-on, spot-on e injetáveis) não é permitida a reaplicação do produto, sendo que as avaliações devem efetuadas 24, 48 e 72 horas em todos os grupos. Na última observação realizada todas as larvas deverão ser removidas e classificadas em vivas ou mortas.

Eficácia mata-bicheira: **[(média aritmética de larvas vivas do grupo controle – média aritmética de larvas vivas do grupo medicado) ÷ (média aritmética de larvas vivas do grupo controle)] X 100.**

Ao término do estudo, todos os animais devem ser tratados com mata-bicheira de uso tópico e acompanhados até a completa cicatrização das feridas.

1.5.2 - Estudo controlado com infestação natural em feridas induzidas

Os animais devem ser mantidos a campo na mesma pastagem e as feridas examinadas 2 vezes por dia até a verificação da presença de larvas de 1^o, 2^o e 3^o instares de *C. hominivorax*, sendo possível também a observação de posturas nas bordas das feridas. O produto em estudo deve ser administrado nos animais do grupo tratado e as observações e registros necessários devem ser anotados nos dois grupos de interesse.

Deve-se utilizar no mínimo 6 animais com uma míase induzida artificialmente. A míase deve ser estabelecida por meio de incisão cutânea de aproximadamente 4 centímetros de diâmetro, os animais devem ser mantidos a campo na mesma pastagem e as feridas examinadas 2 vezes por dia até a verificação da presença de larvas de 1^o, 2^o e 3^o instares de *C. hominivorax*, oriundas de infestação naturais, sendo possível também a observação de posturas nas bordas das feridas. O procedimento da realização das incisões deve ser realizado sob anestesia local e com os animais sedados. Paralelamente, 3 animais infestados sob as mesmas condições deverão ser mantidos como grupo controle. Até 2 dias após a infestação, de acordo com o desenvolvimento das lesões, o produto deve ser administrado.

Deve-se proceder com o exame dos animais após 24 e 48 horas da aplicação e os resultados registrados, quanto a presença ou não de larvas vivas. É permitida a limpeza das feridas. No caso da presença de larvas vivas, 48 horas após a primeira administração, permite-se a reaplicação do produto tópico (de aplicação sobre as feridas) apenas nas feridas positivas. Em tratamentos parenterais ou tópicos (pour-on, spot-on e injetáveis) não é permitida a reaplicação do produto, sendo que as avaliações devem efetuadas 24, 48 e 72 horas em todos os grupos. Na última observação realizada todas as larvas deverão ser removidas e classificadas em vivas ou mortas.

Eficácia mata-bicheira: **[(média aritmética de larvas vivas do grupo controle – média aritmética de larvas vivas do grupo medicado) ÷ (média aritmética de larvas vivas do grupo controle)] X 100.**

Ao término do estudo, todos os animais devem ser tratados com mata-bicheira de uso tópico e acompanhados até a completa cicatrização das feridas.

1.5.3 - Estudo controlado com infestação natural sem indução de feridas

Os estudos para mata-bicheiras podem ser realizados com base no tratamento de míases não induzidas, ou seja, registrando-se e documentando-se casos de ocorrência natural em ferimentos, castrações, descorna, míases umbilicais e outros. Neste caso cada animal será considerado como seu próprio controle, com base nos exames pré e pós-tratamento. As observações e registros necessários serão os mesmos estabelecidos para os itens

1.5.1 e 1.5.2. O número mínimo de animais medicados é crítico para assegurar a eficácia do produto nestas condições, desta forma o número mínimo indicado é de 30 animais.

Eficácia mata-bicheira: **$[(\text{número de animais positivos antes do tratamento} - \text{média número de a animais positivos depois do tratamento}) \div (\text{número de animais positivos antes do tratamento})] \times 100$**

Ao término do estudo, todos os animais devem ser tratados com mata bicheira de uso tópico e acompanhados até a completa cicatrização das feridas.

1.5.4 - Estudo controlado para avaliação da repelência de mata-bicheiras

Para a demonstração da atividade repelente deve-se empregar o método descrito no item 1.5.1. para a realização das feridas artificiais. Após a indução das lesões em ambos os grupos e tratamento dos animais do grupo tratado, estes devem ser alojados em piquetes separados, porém próximos. O ranqueamento deverá ser realizado com base no peso dos animais. Deve-se registrar o número de posturas de *C. hominivorax* nas bordas das feridas em intervalos de 24, 48 e 72 horas após a indução das mesmas. Findas as avaliações, todos os animais devem ser tratados e o ensaio encerrado. Para efeito de cálculo da atividade de repelência do produto serão comparados os números médios de posturas registradas nos animais controles e nos tratados medicados durante o período total de 72 horas.

Eficácia repelente: **$[(\text{média aritmética posturas do grupo controle} - \text{média aritmética de posturas do grupo medicado}) \div (\text{média aritmética de posturas do grupo controle})] \times 100$** .

1.6. Estudos Mosquicidas

1.6.1 - Estudo controlado em instalações rurais

O inseticida será aplicado sobre paredes internas e externas de madeira e alvenaria de instalações rurais. O número de moscas será registrado antes do tratamento e a intervalos semanais após o tratamento até que o efeito do inseticida tenha desaparecido. Observações similares serão realizadas nas instalações não tratadas (controle). Para determinar o número de moscas se recomenda contar o número de exemplares que pousam durante um minuto sobre uma superfície de 0,25m².

A metodologia alternativa a seguir também pode ser empregada: As moscas são contadas em uma grade (grade de Scudder) colocada sobre uma concentração natural de moscas. A grade, 16-24 ripas de madeira colocadas a intervalos regulares em uma área de 0.8 m² (grade maior) até 0.2 m² (grade menor). A grade maior é destinada somente ao uso externo. Para contagem de moscas, baixa-se a grade sobre uma concentração de moscas. As moscas se movem mas retornam ao que as atrai, e ficam temporariamente na grade. O número de moscas que pousam durante 30 segundos é então contado. Em cada local as contagens serão feitas 3 (três) ou mais vezes, nas áreas de concentrações mais elevadas de moscas, obtendo-se assim uma média do resultado. Em cada área poderá existir estações fixas e móveis. Para efeito de comparação, as contagens em estações fixas devem ser feitas no mesmo período do dia.

A eficácia do inseticida será avaliada comparando-se as populações de moscas nas instalações tratadas com as não tratadas, por meio da fórmula: **$[(\text{média aritmética de moscas nas instalações não tratadas} - \text{média aritmética de moscas nas instalações tratadas}) \div (\text{média aritmética de moscas nas instalações não tratadas})] \times 100$** .

1.6.2 - Estudo controlado para iscas mosquicidas

Determinada a quantidade de isca (sólida ou líquida), a mesma deverá ser colocada numa placa de Petri, a qual deve ser colocada no centro de uma superfície de 1 m² (usar papelão, papel ou similar). Sobre outra superfície de 1 m², em outra placa de Petri, situada até 2 metros, no máximo, da primeira, deve-se colocar isca sem o ingrediente ativo (placebo). Trinta minutos após, todas as moscas mortas devem ser contadas e retiradas em cada uma das superfícies e a posição das placas invertidas. Após 30 minutos adicionais, nova contagem deverá ser realizada, repetindo-se este procedimento até um total de 4 (quatro) vezes.

A percentagem de eficácia deverá ser calculada de acordo com a fórmula: **$[(\text{média aritmética de moscas mortas do grupo controle} - \text{média aritmética de moscas mortas no grupo controle}) \div (\text{média aritmética de moscas mortas no grupo controle})] \times 100$** .

1.6.3 - Estudo controlado para produtos aplicados sobre os animais

Deve ser feito um registro histórico da propriedade que sediou o experimento, no que se refere à sua localização, tipo de exploração, estimativa das populações bovina e outras, bem como a descrição de antecedentes de uso e problemas com mosquicidas, descrevendo-se o tipo e a qualidade das instalações.

Em cada estudo, no mínimo 15 (quinze) animais em um grupo tratado e outros 15 animais em um grupo controle devem ser utilizados para a contagem. No caso específico de ensaios de eficácia contra a mosca-dos-chifre (*Haematobia irritans*), mosca doméstica (*Musca domestica*) e mosca do estábulo (*Stomoxys calcitrans*), os animais tratados e controles deverão ser mantidos em pastagens separadas. O número médio mínimo de moscas nos ensaios com *H. irritans* deve ser de 50 moscas por animal. No dia 0 (zero), os bovinos devem ser listados em ordem decrescente de acordo com a média aritmética de 2 contagens estimadas da população da mosca conduzidas antes do tratamento, e alocados em, no mínimo, 15 pares (um para cada grupo). Os pastos devem ser alocados por sorteio aos grupos tratado e controle.

Estimativas do número de moscas infestando cada animal serão feitas por pessoal devidamente treinado. As estimativas serão feitas em duas ocasiões antes do tratamento, entre o dia -7 e -1 (antes do tratamento), para servir como base de alocação dos animais aos grupos de tratamentos e nos dias +1, +3, +7 e a cada 7 dias (pós-tratamento) pelo tempo que for desejado para determinação da eficácia. Produtos que necessitem de períodos superiores a três dias após o tratamento para atingir os níveis aceitáveis de eficácia, além das justificativas técnicas pertinentes, devem estabelecer o período mínimo necessário para atingirem níveis de eficácia.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: **$[(\text{média aritmética de moscas nos animais controle} - \text{média aritmética de moscas nos animais tratados}) \div (\text{média aritmética de moscas nos animais controle})] \times 100$** .

1.7. Estudos controlado de eficácia para produtos piolhidas

Um número mínimo de 6 animais, natural ou artificialmente infestados, deve ser submetido ao tratamento, sendo que um número igual deve ser mantido como controle. Para aves, o número mínimo deverá ser de 20 animais. Avaliações antes e após o tratamento devem ser realizadas. A metodologia para contagem ou estimativa dos piolhos deve ser justificada. As leituras após o último tratamento devem ocorrer, no mínimo, nos dias 3, 7, 15, 21 e 28.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: [(média aritmética de piolhos vivos nos animais controle – média de aritmética de piolhos vivos nos animais tratados) ÷ (média aritmética de piolhos vivos nos animais controle)] x 100.

1.8. Estudos controlado de eficácia para produtos sarnicidas

Um mínimo de 6 animais infestados natural ou artificialmente deve ser tratado com o produto em avaliação. Um grupo similar deve ser mantido como controle, exceto para sarna demodécica. Antes do tratamento, os animais devem ser listados em ordem decrescente de acordo com a contagem de ácaros, e alocados por sorteio, um ao grupo controle (não tratado) e o outro ao grupo tratado, até que cada grupo contenha, no mínimo, 6 (seis) animais.

Em ovinos, para sarna psoroptica, no dia -30, um mínimo de 50 ácaros adultos (40 fêmeas e 10 machos) deve ser colhido de um animal doador e aplicado a cada um dos animais a serem testados. Os ácaros devem ser colocados na linha média superior da cernelha. A lã ou pelo devem ser protegidos de forma a evitar que o animal coce o local. Alguns ovos e estádios larvais podem ser incluídos com os adultos. Se a condição climática for quente e seca, o local da infestação deve ser molhado diariamente. Após 7 (sete) dias a lesão deve ser inspecionada. Se necessário, uma segunda infestação deve ser efetuada nos animais que não apresentarem infestação adequada.

A contagem de ácaros deve ser pelo seguinte procedimento: Ácaros vivos devem ser identificados e contados em raspagens cutâneas realizadas nos dias -2 ou -1 e +3, e a intervalos semanais a partir do dia 0 (zero) até o dia +28. Em cada ocasião, 2 áreas de cada animal, de no mínimo 1 cm², devem ser raspadas. Estas áreas devem ser selecionadas a partir dos locais onde os ácaros são mais frequentes e que, aparente ou previamente, se apresente como lesão ativa. Os locais das raspagens, devem ser marcados graficamente em uma silhueta de animal, descritos e registrados fotograficamente em cada exame. As leituras após o último tratamento serão feitas, no mínimo nos dias +3, +7, +14, +21 e +28. Após o primeiro resultado negativo de cada animal, este deve ser confirmado em pelo menos mais duas raspagens cutâneas, realizadas a cada 7 dias, em um total de 2 resultados negativos consecutivos.

Para o caso específico de indicação para sarna demodécica em cães, protocolo específico deverá ser desenvolvido. Além de levar em conta a presença ou não de ácaros em raspado de pele após o tratamento deve ser adotado critérios de escore em relação a avaliações clínicas. Neste caso específico não é utilizado grupo controle. Produtos com indicações do fabricante para tratamento em aplicação única ou múltipla têm a sua avaliação realizada após o último tratamento, obedecendo os mesmos critérios.

Para avaliação da eficácia contra sarna otodécica em cães e gatos, a comprovação de positividade bem como as avaliações posteriores ao tratamento, deve ser realizada por meio de exames otoscópicos.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: [(média aritmética de ácaros vivos nos animais controle – média de aritmética de ácaros vivos nos animais tratados) ÷ (média aritmética de ácaros vivos nos animais controle)] x 100.

2. Endoparasiticidas

2.1. Estudos de Eficácia Anti-Helmíntica em Ruminantes

Estudos antihelmínticos são realizados com infecções induzidas artificialmente (para avaliação dos estádios de larvas e adultos) ou em animais portadores de infecções naturalmente adquiridas (usualmente avaliados quanto ao estágio adulto). Estudos com infecções induzidas artificialmente e infecções adquiridas naturalmente propiciarão, certamente, a avaliação simultânea de uma ampla variedade de helmintos.

As indicações do rótulo para helmintos devem ser apenas para parasitos específicos (gênero, espécie e estágio de infecção) contra os quais o composto foi testado e para os quais os dados foram apresentados para estabelecer as indicações

A comprovação de eficácia contra parasitos resistentes exige a realização de estudos cujos métodos se encontram, descritos no item 2.1.1.4. Os testes a seguir descritos aplicam-se à todos os ruminantes, porém devem ser específicos para cada hospedeiro.

Os estudos poderão ser realizados empregando-se animais artificialmente ou naturalmente infectados.

2.1.1 - Estudo controlado com infecção artificial e necropsia

Para realização deste estudo controlado deve-se utilizar, em cada grupo de estudo, um número mínimo de 6 animais, para uma maior confiabilidade estatística um número maior de animais pode ser empregado, infectados com cada uma das espécies de parasitos cuja eficácia do produto seja pretendida, de forma isolada ou mista. Os animais devem ser distribuídos de forma homogênea nos grupos tratado e controle, quanto a determinação de ovos de parasitos por grama de vezes (OPG) resultante da infecção artificial. O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem de OPG (dia -1 no pré-tratamento) mais elevadas de parasito devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha no mínimo 6 animais. Devem ser utilizadas tantas repetições quantas necessárias para o atendimento desta exigência. Recomenda-se utilizar os números de larvas viáveis de terceiro estágio descritos abaixo:

Espécie	Quantidade de larvas infectantes
Bovinos	
<i>Haemonchus placei</i>	5000-10000
<i>Ostertagia ostertagi</i>	10000-20000
<i>Trichostrongylus axei</i>	10000-15000

<i>Cooperia oncophora</i>	10000-15000
<i>Cooperia pectinata</i>	10000-15000
<i>Cooperia punctata</i>	10000-15000
<i>Nematodirus spathiger</i>	3000-6000
<i>Nematodirus helvetianus</i>	3000-6000
<i>Bunostomum phlebotomum</i>	1000
<i>Oesophagostomum radiatum/O. venulosum</i>	1000-2500
<i>Chabertia ovina</i>	1000
<i>Strongyloides papillosus</i>	200000
Ovinos/Caprinos	
<i>Haemonchus contortus</i>	2500-4000
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	5000-10000
<i>Trichostrongylus axei</i>	3000-6000
<i>Trichostrongylus colubriformis</i> e <i>T. vitrinus</i>	3000-6000
<i>Cooperia curticei</i>	3000-6000
<i>Nematodirus spp.</i>	3000-6000
<i>Oesophagostomum columbianum</i>	800
<i>Oesophagostomum venulosum</i>	1000
<i>Bunostomum trigonocephalum</i> (subcutâneo)	1000
<i>Strongyloides papillosus</i> (subcutâneo)	80000
<i>Chabertia ovina</i>	800
<i>Gaigeria pachyscelis</i> (percutâneo)	400

Nas infecções artificiais, para determinar a eficácia contra os vários estágios de parasitos, devem ser observados os períodos de tempo indicados a seguir:

- a. **Adultos:** O tratamento deve ser efetuado entre 28 e 35 dias depois da infecção, exceto para *Strongyloides sp.* (14 a 16 dias), *Oesophagostomum sp.* (35 a 41 dias) e *Bunostomum sp.* (52 a 56 dias). Para *Dictyocaulus sp.* deve se esperar até que larvas de 1º estágio apareçam nas fezes.
- b. **Larvas de quarto estágio (L4):** Em infecções artificiais induzidas, o tratamento deve ocorrer após a inoculação do material infectante: 4-5 dias para *Strongyloides sp.*; 5-6 dias para *Haemonchus sp.*, *Ostertagia sp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia sp.* e *Dictyocaulus sp.*; 3-10 dias para *Nematodirus sp.*; e 15-17 dias para *Oesophagostomum sp.* Em seguida ao tratamento, os parasitos restantes nos animais tratados e controle, podem ser deixados para maturação (respeitando-se seus períodos pré-patentes), o que facilitará o seu recolhimento na necropsia.

c. **Larvas de terceiro estágio (L3):** O tratamento deve ocorrer 2-3 dias após a infecção artificial dos animais a todos os parasitos, exceto *Haemonchus sp.*, que é tratado no 1º-2º dia. A reivindicação de eficácia contra vermes imaturos deve ser tão exata quanto possível. Deve-se referir-se ao estágio de desenvolvimento específico do parasito durante o tratamento. O termo geral "imaturado" não é aceitável, uma vez que ele cobre vários estádios diferentes do ciclo de vida. Para estabelecer normas para estádios específicos de infecções imaturas serão necessários dados similares aos requeridos aos helmintos maduros.

Após a infecção artificial os animais deverão ser mantidos em baias de piso concretado de forma a evitar a ocorrência de infecções naturais.

A eutanásia e a necropsia deverá ser realizada entre os dias 7 a 14 após o tratamento. Períodos de tempo diferentes entre o tratamento e as eutanásias e necropsias, deverão ser justificadas com bases nos guias internacionais e em literatura consagradas.

A eficácia (percentual de eficácia) deve ser calculada por meio da fórmula: **[(média aritmética de helmintos recuperados dos animais controle – média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados) ÷ (média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle)] x 100.**

2.1.2 -Estudos controlado com infecção natural e necropsia

Os animais empregados no estudo devem ser mantidos em regime de pastoreio, em pastagens naturalmente contaminadas com espécies de helmintos, com uma carga mista de parasitos. Os animais não devem ter sido medicados com anti-helmínticos por no mínimo 60 dias antes do início do ensaio, salvo medicamentos de ação acima deste período.

Os animais devem ser examinados com através de OPG individual e de coproculturas por grupo de tratamento, para determinação dos gêneros ou espécies de nematódeos presentes. Devem-se utilizar, em cada grupo de estudo, no mínimo, 6 animais infectados, para uma confiabilidade estatista maior um número maior de animais poderá ser empregado, para cada uma das espécies de parasito cuja eficácia do produto seja pretendida. A contagem individual OPG devem ser no mínimo de 200 ovos por grama de fezes para bovinos e de 500 ovos para ovinos e caprinos. Com base nesses dados os animais devem ser distribuídos em dois grupos de 6 animais, de forma homogênea, segundo o resultado de OPG. O ranqueamento deve ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem de OPG (pré-tratamento) mais elevadas de OPG no dia -1, pré-tratamento, devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado, até completar os grupos com o número de animais desejável. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha no mínimo 6 animais.

No dia -7 antes do tratamento, os animais devem ser transferidos para instalações com piso de concreto, com alimentação e água *ad libitum*. Em pelo menos 3 ocasiões, entre os dias -7 e 0 (zero) antes do tratamento, amostras fecais devem ser colhidas para realização individual do exame de fezes, visando determinação do número de OPG, a presença de larvas de *Dictyocaulus sp.* (quanto necessário) e a realização de coproculturas por grupo, para identificação dos gêneros e espécies de nematódeos. Após o tratamento, os exames de fezes devem ser ainda repetidos a cada 3 dias de intervalo até a eutanásia dos animais.

A eutanásia e a necropsia deverão ser realizadas entre os dias 7 a 14 após o tratamento. Períodos de tempo diferentes entre o tratamento e as eutanásias e necropsias deverão ser justificadas com bases nos guias internacionais e em literatura consagradas.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: **[(média aritmética de helmintos recuperados dos animais controle – média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados) ÷ (média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle)] x 100.**

2.1.3 - Estudo controlado contra larvas inibidas (tipo ii) de *Ostertagia spp.*

Um número mínimo de 6 bovinos, ou ovinos, ou caprinos por tratamento, com maior probabilidade de abrigar larvas hipobióticas de 4º estágio de *Ostertagia spp.*, ou outros nematóides (ex. *Haemonchus sp.*) deve ser incluído. Os animais devem ser confinados para assegurar a não exposição adicional a larvas infectantes de *Ostertagia spp.*. Após 3-4 semanas do confinamento, os animais deverão ser tratados, mantendo-se um grupo controle, sendo eutanasiados 4-7 dias após o tratamento. O abomaso deve ser examinado para a presença de larvas hipobióticas de *Ostertagia spp.* de 4º estágio, incluindo a digestão do órgão.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: **[(média aritmética de helmintos recuperados dos animais controle – média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados) ÷ (média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle)] x 100.**

2.1.4 - Estudo para determinação da eficácia anti-helmíntica contra nematódeos resistentes

As indicações do rótulo dos produtos devem ser apenas para parasitos específicos (gênero, espécie e estágio de infecção) contra os quais o composto foi testado e para os quais os dados foram apresentados para estabelecer as indicações.

2.1.4.1 - Estudo controlado com infecção artificial ou natural, com necropsia

Devem ser empregados, no mínimo, 10 animais com idade susceptível ao parasitismo, e livres de parasitos por grupo, distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (n=30). Dois grupos tratados; um com o anti-helmíntico a ser avaliado e o outro com o anti-helmíntico contra o qual a espécie é resistente; e um terceiro sem tratamento (controle negativo) devem ser empregados. Todos os grupos devem ser infectados artificialmente de acordo com a dose mínima de larvas infectantes (comprovadamente resistentes) por espécie, conforme descrito item 2.1.1.1. A eutanásia e necropsia devem ser realizadas entre os dias 7 a 14 após o tratamento. Períodos de tempo diferentes entre o tratamento e as eutanásias e necropsias deverão ser justificadas com bases nos guias internacionais e em literatura consagradas.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: **[(média aritmética de helmintos recuperados dos animais controle – média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados) ÷ (média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle)] x 100.**

Para ser alegada atividade anti-helmíntica desejável ou justificada contra uma determinada espécie de helminto resistente, o anti-helmíntico contra o qual é alegada resistência, deverá apresentar eficácia inferior a 60% ao parasito em questão, quando empregado na dose recomendada

2.1.4.2 - Estudo controlado com infecção natural com redução de OPG

Três grupos com no mínimo 30 (trinta) animais naturalmente infectados, com diagnóstico de infecção acima de 200 ovos por grama e mantidos na mesma pastagem, serão examinados no dia -7 (zero) para a determinação de OPG, bem como para realização de coproculturas. Um grupo será mantido como controle e os outros dois, serão tratados com o produto em teste e com o produto contra o qual a espécie do parasito é considerada resistente, respectivamente. Exames de OPG e coproculturas serão efetuados novamente no dia +10 após o tratamento. Se sugere utilizar a diluição das fezes com fator de conversão de x25 para cada ovo nas fezes.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: $[(\text{média aritmética de OPG dos animais controle} - \text{média de aritmética de OPG nos animais tratados}) \div (\text{média aritmética de OPG nos animais controle})] \times 100$.

Para ser alegada atividade anti-helmíntica desejável ou justificada contra uma determinada espécie de helminto resistente, o anti-helmíntico contra o qual é alegada resistência, deverá apresentar eficácia inferior a 60% ao parasito em questão, quando empregado na dose recomendada.

2.1.5 - Estudo controlado com infecção natural contra formas adultas de cestóides

Animais usados em estudos de eficácia contra *Moniezia spp.* serão considerados infectados ao constatar a presença de ovos ou segmentos nas fezes. Pelo menos 12 animais devem ser alocados por grupo, tratamento e controle. O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem de OPG (pré-tratamento) mais elevadas de parasito devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 12 animais. Um período de 12 dias deve ser respeitado entre o tratamento e a eutanásia, de modo a permitir o crescimento e consequentemente facilitar o recolhimento e identificação dos escólices não removidos pela ação do medicamento. Somente estróbilos com escólices devem ser contados à necropsia.

A eficácia será calculada com a fórmula = $[(\text{média aritmética de helmintos recuperados dos animais controle} - \text{média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados}) \div (\text{média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle})] \times 100$.

As indicações do rótulo para cestódeos quanto devem ser apenas para parasitos específicos (gênero, espécie e estágio de infecção) contra os quais o composto foi testado e para os quais os dados foram apresentados para estabelecer as indicações.

2.1.6 - Estudo controlado com infecção artificial de eficácia contra metacestóides de *Taenia saginata* a (*Cysticercus bovis*)

Deve ser conduzido estudo controlado com infecção experimental, com, no mínimo, 12 bovinos por grupo. Estes animais devem ser infectados artificialmente com ovos embrionados de *Taenia saginata* por via oral (a quantidade do inoculo deve ser estabelecida pelo investigador, sendo o valor mínimo exigido de 500 ovos). Dez semanas após a infecção experimental, os animais serão distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais. O esquema do tratamento, se único, diário ou em intervalos regulares, deverá ser apresentado com justificativas. A eutanásia e o exame da carcaça e vísceras deve ser efetuado até 45 dias após a última administração do produto. O estudo pode ser realizado empregando-se diversas repetições, até que se atinja 6 animais positivos para o grupo controle. A eficácia do produto deve ser calculada considerando-se apenas a média de cisticercos ativos, ou seja, não calcificados ou degenerados, nos animais de ambos os grupos. A viabilidade dos cisticercos recuperados deve ser estabelecida conforme técnicas disponíveis na literatura científica e deve constar no protocolo proposto.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: $[(\text{média aritmética de cisticercos viáveis recuperados dos animais controle} - \text{média de aritmética de cisticercos viáveis recuperados nos animais tratados}) \div (\text{média aritmética de cisticercos recuperados nos animais controle})] \times 100$.

2.1.7 -Estudos contra trematodas

2.1.7.1 - Estudo controlado com infecção artificial

Para as diferentes formas evolutivas de *Fasciola hepatica* devem ser apresentados estudos com infecções induzidas em no mínimo 6 animais por grupo, utilizando no mínimo 400 metacercárias em bovinos e 200 em ovinos. Os produtos devem demonstrar eficácia em parasitos nas seguintes semanas de idade:

- Imaturos jovens: 1-4 semanas, migração no parênquima
- Imaturos tardios: 6-8 semanas, pré-patente nos ductos biliares
- Maduros: 12-14 semanas, nos ductos biliares

Os estudos de eficácia para *F. hepatica*, com infecção em período de tempo inferior a 4 semanas, são opcionais. O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem de OPG (pré-tratamento) mais elevadas de parasito devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve-se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 6 animais. A necropsia para avaliação da eficácia contra formas maduras deve ser feita após 2-3 semanas do tratamento. Para formas imaturas, a necropsia deve ser adiada até a maturação do parasito, para que as mesmas possam ser mais facilmente identificadas e contadas.

A eficácia contra trematódeos deve ser determinada pela comparação do número de vermes vivos nos animais tratados com aqueles encontrados nos controles, conforme a fórmula: $[(\text{média aritmética de helmintos recuperados dos animais controle} - \text{média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados}) \div (\text{média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle})] \times 100$.

2.1.7.2 -Estudo controlado com infecção natural

Alternativamente ao protocolo com infecção induzida, a eficácia para *F. hepatica*, pode ser demonstrada em animais naturalmente infectados e distribuídos aleatoriamente, aplicando-se o método controlado, com no mínimo de 10 animais em cada grupo. O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem de OPG (pré-tratamento) mais elevadas devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve-se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 10 animais

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: $[(\text{média aritmética de helmintos recuperados dos animais controle} - \text{média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados}) \div (\text{média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle})] \times 100$.

2.1.7.3 - Estudo controlado com infecção natural (teste de campo)

.Frequentemente, nesse tipo de estudo, determina-se a eficácia antiparasitária pelo OPG. Pelo menos duas avaliações fecais deverão ser feitas antes do tratamento e 3 vezes após o tratamento, nos dias +7 e +14 e +21, após o tratamento.

Dados de pelo menos 10 animais tratados devem ser obtidos, assim como para o grupo controle. Qualquer uma das técnicas de contagem convencionalmente usada será aceita, desde que a mesma técnica seja mantida durante todo experimento. O método usado deve ser descrito juntamente com outros dados. Nos estudos clínicos em condições de campo, a eficácia deve ser determinada comparando-se as contagens OPG de animais tratados contra as contagens do grupo controle, realizadas 7, 14, 21, 28 dias após o tratamento.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: $[(\text{média aritmética de OPG dos animais controle} - \text{média de aritmética de OPG nos animais tratados}) \div (\text{média aritmética de OPG nos animais controle})] \times 100$.

As indicações do rótulo para helmintos devem ser apenas para parasitos específicos (gênero, espécie e estágio de infecção) contra os quais o composto foi testado e para os quais os dados foram apresentados para estabelecer as indicações

2.2 - Estudos de Eficácia para Anti-Helmínticos em Equídeos.

2.2.1 - Estudo controlado com infecção artificial ou natural

Para realização do estudo controlado deve-se utilizar, um mínimo de 6 (seis) animais por grupo. Os animais do grupo infectado devem conter as espécies de parasitos cuja eficácia do produto seja pretendida. Os animais devem ser distribuídos de forma homogênea e o ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem de OPG (pré-tratamento) mais elevadas devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve-se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 6 (seis) animais, contendo todas as por espécies desejadas. Se sugere utilizar a diluição das fezes com fator de conversão de x 25 para cada ovo nas fezes. Deve-se utilizar tantas repetições quantas necessárias para o atendimento desta exigência. Isolados mistos e específicos de helmintos deverão ser empregados, para tanto suas quantidades infectantes devem ser registradas e devidamente justificadas. Nas infecções induzidas artificialmente, para avaliar a eficácia contra os vários estágios de parasitos deve-se justificar os períodos de tempo entre as infecções e os tratamentos. Nas infecções naturais devem ser empregados animais que tenham histórico da não utilização de anti-helmíntico e que nos exames de fezes anteriores ao tratamento estejam positivos para as espécies que se deseja indicação.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: **[(média aritmética de helmintos recuperados dos animais controle – média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados) ÷ (média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle)] x 100.**

As indicações do rótulo, tanto para cestódeos quanto para helmintos, devem ser apenas para parasitos específicos (gênero, espécie e estágio de infecção) contra os quais o composto foi testado e para os quais os dados foram apresentados para estabelecer as indicações

2.2.2 - Estudo controlado com infecção natural (teste de campo)

2.2.2.1 - Estudo controlado com infecção natural e necropsia (teste crítico)

Alternativamente ao estudo controlado descrito acima, o estudo crítico se caracteriza quando cada animal é seu próprio controle, pode ser empregado para avaliação da eficácia anti-helmíntica de parasitos gastrintestinais e larvas de *Gasterophilus sp.* Após um período de aclimação de aproximadamente 7 dias, os animais devem ser mantidos isoladamente em baias e medicados com o produto em teste. A partir do dia +1 até o dia +7 após o tratamento, as fezes totais eliminadas serão examinadas e os parasitos recuperados e fixados para posterior identificação e contagem. Esse período poderá ser estendido por até 14 dias, desde que justificado com base nas características de farmacocinética do produto em teste. Neste caso são recuperados principalmente nematódeos como *Parascaris equorum*, *Oxyuris equi* e *Strongylus sp.* No caso de pequenos estrongilos, deve ser retirado alíquotas com base no peso total das fezes eliminadas diariamente e que, após fixação, poderão ser quantificadas e identificadas. A partir do último dia da realização dos exames coproparasitológicos, os animais devem ser eutanasiados e posteriormente necropsiados. A eutanásia e necropsia deverá ser realizada entre os dias 12 a 14 após o tratamento. Períodos de tempo diferentes entre o tratamento e as eutanásias e necropsias deverão ser justificadas com bases nos guias internacionais e em literatura científica consagradas.

Deve-se quantificar e identificar os parasitos encontrados no trato gastrintestinal, podendo também utilizar alíquotas do conteúdo total recuperado, como efetuado com relação às fezes totais. O cálculo para determinação da eficácia do anti-helmíntico será realizado com base na seguinte fórmula: **Eficácia = [(número de parasitos expelidos nas fezes) ÷ (número de parasitos expelidos nas fezes + número de parasitos recuperados na necropsia)] x 100.**

A maior desvantagem do estudo crítico é que pequenos nematódeos do estômago e do intestino delgado podem passar parcialmente digeridos podendo mascarar o resultado final. Para inclusão de indicação da eficácia com relação a formas imaturas, principalmente estágios que não se encontram no lúmen intestinal, será necessário a utilização do teste controlado.

As indicações do rótulo, tanto para cestódeos quanto para helmintos, devem ser apenas para parasitos específicos (gênero, espécie e estágio de infecção) contra os quais o composto foi testado e para os quais os dados foram apresentados para estabelecer as indicações

2.2.2.2 - Estudo controlado para cestódeos em equídeos (teste crítico)

Recomenda-se a utilização de no mínimo 6 animais infectados, (com comprovação prévia por exames de fezes) para cada espécie de parasito indicado para o produto por grupo (controle e tratado). Para tanto, podem ser utilizadas tantas repetições quantas necessárias para o atendimento do exposto acima.

O estudo crítico, particularmente em relação a *Anoplocephala perfoliata*, envolve a eutanásia, seguida pela recuperação e observação dos cestódeos, 48 horas após a data do tratamento. Na necropsia, os exemplares de *Anoplocephala sp.* encontrados no íleo e no ceco e serão considerados como não afetados pelo tratamento. A eficácia do produto deve ser calculada pela equação: **[(número de cestódeos recuperados nas fezes + número de cestódeos encontrados não fixados na mucosa intestinal) ÷ (número de cestódeos recuperados nas fezes + número de cestódeos encontrados não fixados na mucosa intestinal + número de cestódeos encontrados no íleo, ceco e fixados a mucosa) x 100].**

As indicações do rótulo para cestódeos devem ser apenas para parasitos específicos (gênero, espécie e estágio de infecção) contra os quais o composto foi testado e para os quais os dados foram apresentados para estabelecer as indicações.

2.2.2.3 - Estudos controlado com infecção natural e OPG

Os animais devem ser tratados com a dose, o modo de administração e a formulação final do produto a ser comercializado. Frequentemente, nesse tipo de experimento, determina-se a eficácia antiparasitária pela contagem de OPG e coprocultura e, em certos casos, pela contagem de larvas e diferenciação larval. Pelo menos duas avaliações fecais (-7 e -1) devem ser feitas antes do tratamento e 3 vezes após o tratamento (+7, +14 e +21) ou até persistir o efeito do tratamento.

Dados de pelo menos 10 animais por grupos devem ser obtidos. Um mínimo de 10 animais, como controle não tratado, deve ser incluído no estudo. O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem de OPG (pré-tratamento) mais elevadas de parasito devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 10 animais, sendo que o menor OPG seja de 200 ovos. Se sugere utilizar a diluição das fezes com fator de conversão de x 25 para cada ovo nas fezes encontrado. Qualquer uma das técnicas de contagem convencionalmente usadas será aceita, desde que a mesma técnica seja mantida durante todo experimento. O método usado deve ser descrito juntamente com outros dados. Nos estudos clínicos em condições de campo, a eficácia será

determinada comparando-se as contagens de ovos nas fezes de animais tratados e controles, semanalmente e até durar a redução na contagem de ovos após o tratamento.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: **[(média aritmética de OPG dos animais controle – média de aritmética de OPG nos animais tratados) ÷ (média aritmética de OPG nos animais controle)] x 100.**

As indicações de eficácia devem ser apenas para parasitos específicos (gênero, espécie e estágio de infecção) contra os quais o composto foi testado e para os quais os dados foram apresentados para estabelecer as indicações.

2.3. Estudos de eficácia anti-helmíntica em suínos

2.3.1 - Estudo controlado com infecção natural e necropsia

É recomendada a utilização de no mínimo 6 animais infectados para cada espécie de parasito indicado para o produto por grupo (controle e tratado), incluindo a possibilidade de infecção mista. O estudo controlado poderá incluir quantas repetições forem necessárias, sempre com grupos de seis animais, para embasar as recomendações da bula, pois algumas espécies são mais frequentes em leitões, exemplo, *Ascaris suum* e *Strongyloides ransomi*, enquanto outras em suínos adultos, *Stephanurus dentatus*.

Na distribuição dos suínos nos grupos em estudo deve ser utilizado método de alocação que possibilite estudos estatísticos apropriados. O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem de OPG (pré-tratamento; dia -1 ou zero) mais elevadas de parasito devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 6 animais e contenha OPG (acima de 200) e desvio padrão semelhante. Os animais devem ser eutanasiados e necropsiados entre 7 e 14 dias após a medicação. Períodos de tempo diferentes entre o tratamento e as eutanásias e necropsias deverão ser justificadas com base nos guias internacionais e em literatura consagradas.

As indicações do rótulo devem ser apenas para parasitos específicos (gênero, espécie e estágio de infecção) contra os quais o composto foi testado e para os quais os dados foram apresentados para estabelecer as indicações.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: **[(média aritmética de helmintos recuperados dos animais controle – média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados) ÷ (média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle)] x 100.**

2.3.2 - Estudo controlado com infecção natural e OPG

Um mínimo de 15 suínos de cada categoria (leitões após desmama, crescimento-terminação e matrizes) de acordo com a indicação do produto e a prevalência do parasito em questão deve ser empregado em cada estudo. Exames de fezes (OPG) e ou de urina deverão ser realizados e quantificados antes e após o tratamento, entre os dias -7 a 0 e dias +7 a +14. O cálculo da eficácia referente a redução do OPG poderá ser calculado comparando as médias antes e após a medicação.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: **[(média aritmética de OPG dos animais antes do tratamento - média aritmética de OPG dos animais depois do tratamento) ÷ (média aritmética de OPG antes do tratamento)] x 100.**

2.4. Estudo Controlado de Eficácia Anti-helmíntica em Aves Produtoras de Alimento Destinado ao Consumo Humano

Devem ser empregadas, no mínimo, 10 aves por repetição, de preferência com infecções naturais. Para realização do estudo controlado é recomendada a utilização de no mínimo 10 (dez) aves infectadas para cada espécie de parasito indicado (infecções mistas) para o produto por grupo (controle e tratado). Devem ser realizadas quantas repetições forem necessárias para a confirmação da eficácia contra os diferentes gêneros de helmintos, tais como *Ascaridia sp.*, *Strongyloides sp.*, *Capillaria sp.*, *Raillietina sp.*, *Davainea sp.* e outros. Para inclusão de indicação em bula com relação à eficácia contra formas imaturas, deve-se utilizar o teste controlado com infecções induzidas.

Para estudos utilizando-se infecções artificiais o protocolo proposto deve indicar a quantidade de inóculo, ovos ou larvas e inclusive de hospedeiros intermediários obrigatórios.

Para que exista uma distribuição homogênea das médias, a distribuição das aves deve ser baseada em resultados de exames parasitológicos prévios. O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem de OPG, no pré-tratamento (dia -1 ou zero), mais elevadas de parasito devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado, contendo média e desvio padrão semelhante. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 10 animais. Após a distribuição e tratamento, os animais devem ser mantidos em gaiolas individuais até a eutanásia e necropsia, que deverá ser efetuada no mínimo 12 dias após a administração do produto, ou a critério da empresa interessada e devidamente justificado.

Todos os resultados devem ser relatados, independentemente se o número mínimo exigido de repetições tiver sido cumprido no somatório das repetições anteriores. O consumo diário de água de bebida e de ração, sejam elas medicadas ou não, deve ser registrado diariamente, assim como o cálculo total do ingrediente ativo ingerido por ave (mg/peso corpóreo); independente se a indicação pelo tratamento for através de ingestão do produto por água ou bebida ou por mistura e ração.

A eficácia deve ser calculada por meio da fórmula: **[(média aritmética de helmintos¹ recuperados dos animais controle – média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados) ÷ (média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle)] x 100.**

1. No caso de cestóides deverá ser considerado no cálculo somente dos estróbilos contendo escolicés

2.5. Estudos Controlado de Eficácia Anti-helmíntica em Aves Canoras e Ornamentais

O estudo controlado deve ser realizado na espécie de ave a que se pretende indicar o produto, utilizando no mínimo 10 aves por repetição. Estudos devem ser realizados de preferência com infecções naturais seguindo a metodologia do item 2.4.

2.6. Estudos de Eficácia Anti-helmíntica em Caninos e Felinos.

2.6.1 - Estudo controlado com infecção artificial ou natural

Para avaliação da eficácia em estudo controlado serão necessários, no mínimo, 6 (seis) cães ou gatos naturalmente infectados por repetição (tratados e controle) adequadamente pré-selecionados por exame de fezes. O estudo controlado pode incluir quantas repetições forem necessárias, sempre com grupos de 6 animais, para embasar as recomendações da bula. Os animais devem ser distribuídos em dois grupos de forma homogênea, seguindo o peso vivo e a carga parasitária. O ranqueamento deverá ser realizado da seguinte forma: os 2 animais com a contagem de OPG (pré-tratamento) mais elevadas de parasito devem ser alocados por sorteio, sendo um ao grupo controle e o outro ao grupo tratado. Deve se repetir o procedimento até que cada grupo contenha 6 animais.

Caso haja interesse em avaliar a eficácia do produto contra formas adultas ou imaturas, por meio de infecções artificiais, sugerem-se os seguintes valores de termos infectantes para cães:

<i>Toxocara canis</i>	100 – 500 (1)
<i>Toxascaris leonina</i>	200 – 3000
<i>Ancylostoma caninum</i>	100 – 300
<i>Ancylostoma braziliense</i>	100 – 300
<i>Uncinaria stenocephala</i>	1000 – 1500
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1000 – 5000
<i>Taenia sp</i>	5 – 15
<i>Trichuris vulpis</i>	100 – 500

(1) em cães em amamentação ou com idade inferior a cinco meses.

A eutanásia deve ser realizada de acordo com as normas legais vigentes entre, 7 a 14 dias após a data do tratamento. Na necropsia devem ser seguidas as normas de rotina para coleta, fixação, identificação e quantificação laboratorial. Todos os animais devem eutanasiados no oitavo dia após o tratamento, ou em data previamente estabelecida, segundo justificativa técnica relacionada a farmacocinética ou biodisponibilidade da substância ativa do produto antiparasitário.

O estudo controlado é o mais recomendado, entretanto para alguns parasitos específicos, o estudo crítico pode ser apropriado e considerado. Infecções naturais são recomendadas para maioria das provas de avaliação de eficácia, com exceção da equinococose e dirofilariose por questões de saúde pública (equinococose) e por complexidade nas indicações com relação ao verme do coração (*Dirofilaria immitis*). Estas duas situações serão abordadas separadamente. Em função da baixa prevalência de infecções naturais por parasitos específicos, como *Dioctophyma renale*, *Capillaria aerophila*, *C. plica*, *Spirocerca lupi*, *Physaloptera sp.*, *Metacestoides sp.* e outros, infecções experimentais devem ser consideradas para efeito da inclusão terapêutica contra estes parasitos na bula. Para a inclusão de eficácia contra os estágios larvários, apenas infecções induzidas serão aceitas.

No caso de avaliação da eficácia anti-helmíntica para formas adultas de *D. immitis* podem ser empregados cães naturalmente parasitados, depois de confirmada a positividade por exames de sangue conforme técnicas específicas descritas na literatura. Deve-se tomar o devido cuidado na diferenciação de microfíliarias de *D. immitis* das microfíliarias de *D. repens* e de *Dipetalonema sp.*. Cada repetição poderá incluir no mínimo dois cães alocados ao acaso, um tratado e um controle, ou repetições em pares até completar um total de 6 (seis) cães tratados e 6 (seis) cães controle. A necropsia deverá ser efetuada entre 1 (um) ou 2 (dois) meses, dependendo da natureza do composto.

A eficácia para o estudo controlado deve ser calculada por meio da fórmula: $[(\text{média aritmética de helmintos}^1 \text{ recuperados dos animais controle} - \text{média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados}) \div (\text{média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle})] \times 100$.

1. No caso de cestoides deverá ser considerado no cálculo somente estróbilos contendo escólices

No caso específico de inclusão da indicação para tratamento de infecções por *Echinococcus granulosus*, serão considerados dados da literatura científica internacional, desde que o fármaco, a via de administração e a dose preconizada estejam de acordo com a bibliografia apresentada ou que sejam realizados ensaios com os cuidados necessários, inclusive com necessidade de aprovação prévia do protocolo específico.

2.6.2 - Estudo crítico

Admite-se a opção pelo estudo crítico, particularmente para ascarídeos. O número mínimo de 6 (seis) animais devem ser incluídos, comprovadamente positivo por exames de fezes ou por eliminação natural por ascarídeos nas fezes. Após um período de aclimação e isolamento de no mínimo 7 (sete) dias, os animais devem ser tratados seguindo dose e via de administração recomendada. Todo o conteúdo fecal eliminado, diariamente pelo período de 7 (sete) dias consecutivos deve ser fixado em frascos previamente identificados para exame, identificação e quantificação dos parasitos eliminados.

A eficácia será calculada com a fórmula: $\% = [(\text{número de parasitos expelidos nas fezes}) \div (\text{número de parasitos expelidos nas fezes} + \text{número de parasitos recuperados na necropsia})] \times 100$.

2.6.3 - Estudo controlado substitutivo de eficácia de anti-helmínticos para cães e gatos

Quando se tratar de formulações e de posologia que possam ser consideradas de uso consagrado, será considerada a possibilidade de avaliação da eficácia anti-helmíntica em cães e gatos com base em exames coproparasitológicos, empregando-se técnicas quantitativas e qualitativas, bem como combinações pertinentes. O estudo experimental deverá ser constituído de no mínimo 20 cães ou gatos tratados, sendo no mínimo seis para cada gênero de helminto a ser incluído na indicação. São necessários, no mínimo, dois estudos em regiões distintas, conduzidos sob a responsabilidade técnica de profissionais e de instituições distintas. As técnicas para avaliação da atividade anti-helmíntica devem ser quantitativas, permitindo cálculos da redução efetivas do número de ovos presentes nas fezes antes (entre 7 a 1 dia pré-tratamento) e após a medicação (entre 7 a 14 dias após o tratamento). O cálculo da eficácia será baseado no resultado individual do exame de fezes efetuados antes e após o tratamento para cada animal e deve ser expresso por gênero de parasito. Para efeito de referência nas indicações, as denominações deverão ser genéricas, exemplo, *Toxocara sp.* e *Ancylostoma sp.*

A eficácia deve ser calculada para métodos quantitativos por meio da fórmula: $[(\text{média aritmética de OPG dos animais antes do tratamento} - \text{média de aritmética de OPG nos animais depois do tratamento}) \div (\text{média aritmética de OPG nos animais antes do tratamento})] \times 100$.

A eficácia deve ser calculada para métodos qualitativos por meio da fórmula: $[(\text{número de animais positivos antes do tratamento} - \text{média número de a animais positivos depois do tratamento}) \div (\text{número de animais positivos antes do tratamento})] \times 100$

2.6.4 - Estudo controlado de eficácia preventiva para o verme do coração (*Dirofilaria immitis*)

Recomenda-se o estudo controlado com a utilização de, no mínimo, 6 (seis) cães por grupo e 8 (oito) gatos por grupo. Os animais incluídos no estudo devem ter histórico de negatividade com relação ao plantel de cães onde serão adquiridos. Sugere-se que cães e gatos com idade de 3 (três) a 6 (seis) meses, sejam adquiridos de canis ou gatis, cujos reprodutores e demais animais com mais 10 meses de idade tenham histórico negativo para infecção por *D. immitis*, comprovado por meio de exames específicos. No dia 0 (zero) do ensaio, de acordo com uma distribuição aleatória (em termos de peso vivo, idade, raça e sexo), deve-se medicar os grupos (tratado e controle) com o produto em teste ou com placebo, respectivamente. No dia +2 todos os animais devem ser infectados experimentalmente com 50 larvas infectantes (L₃), no caso de cães e 100 larvas infectantes em caso de gatos, de *D. immitis* obtidas de infecções de mosquitos, preferencialmente de *Aedes aegypti*, por via subcutânea. As necropsias para pesquisa e recuperação das formas adultas devem ser efetuadas entre 150 a 180, dias, após a infecção experimental. Devem ser efetuados tantos tratamentos quando necessários durante o desenvolvimento do ensaio, com as recomendações de intervalos preconizadas para inclusão em bula, mesmo que efetuado um único desafio, no dia +2 após o único tratamento. Para efeito de cálculo da eficácia, utiliza-se a equação básica do teste controlado a seguinte fórmula: $\%[(\text{média aritmética de helmintos}^1 \text{ recuperados dos animais controle} - \text{média de aritmética de helmintos recuperados nos animais tratados}) \div (\text{média aritmética de helmintos recuperados nos animais controle})] \times 100$.

3. ESTUDO CONTROLADO PARA ANTI-COCCIDIANOS (EFICÁCIA PREVENTIVA)

Pintos de corte (machos e fêmeas) com 1 dia de idade, oriundos de um mesmo lote de matrizes, devem ser empregados. As aves devem ser distribuídas em boxes em grupos de 40 a 60 aves cada, em densidade de 12 (doze) a 15 (quinze) aves/m², o que corresponde a uma repetição. Um mínimo de dez repetições será utilizado para cada tratamento. Obrigatoriamente, deve-se incluir em cada repetição, um grupo controle infectado não tratado e, preferencialmente, um grupo não infectado não tratado. A infecção deve ser realizada pela incorporação do infectante à ração, em concentrações previamente estabelecidas na pré-titulação. Todas as aves, com a exceção do grupo não infectado não tratado, devem ser expostas artificialmente aos oocistos esporulados, provenientes de cepas nacionais recentemente isoladas, por meio da ração aos 20 a 22 dias de idade.

Em frangos de corte, deve se empregar oocistos esporulados de pelo menos 3 espécies de Eimeria, incluindo, necessariamente, *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*. A potência do inóculo deve ser conhecida (pré-titulada) e suficiente para que, durante o estudo, se obtenha uma mortalidade por coccidiose entre 10 a 25% no grupo controle não tratado.

O produto a ser avaliado deve ser incorporado à ração e fornecido as aves a partir do primeiro dia de vida, durante todo o período experimental, respeitando-se o eventual período de retirada. Antes do início do estudo, deve ser realizada avaliação da homogeneidade e do doseamento do princípio ativo na ração formulada com o produto que será fornecido às aves. No sexto dia após a inoculação dos oocistos, devem ser submetidas à eutanásia 04 aves para visualização das lesões de coccidiose à necropsia. Em caso de boxes com animais dos dois gêneros, devem ser eutanasiadas duas aves de cada. Oportivamente, seguindo o mesmo procedimento anterior, entre o +10 e +12 dias após a inoculação de oocistos, quatro aves podem ser necropsiadas aleatoriamente, para determinar o escore das lesões.

As condições ambientais (temperatura e umidade) devem ser registradas e controladas durante todo o período experimental. O consumo de ração e o peso devem ser determinados após cada fase de crescimento, durante todo o experimento.

Os seguintes parâmetros devem utilizados: mortalidade, mortalidade devido à coccidiose, escore de lesões, ganho de peso, consumo e conversão alimentar e efeitos colaterais, os quais devem ser registrados em um formulário específico. Os seguintes parâmetros devem ser observados e registrados diariamente: consumo de ração, umidade da cama, empenamento, sintomatologia nervosa e demais alterações pertinentes a critério do pesquisador. A avaliação do grau de lesões obedecerá a uma escala de 0 (zero) a 4, segundo o critério de Johnson e Reid, 1970 (Exp. Parasitol., v.28, p.30-36, 1970).

O produto deve demonstrar diferença estatisticamente significativa favorável em relação ao controle infectado não tratado para os seguintes critérios: escore de lesões (intestino superior, médio e inferior, e ceco), ganho de peso diário e conversão alimentar. Os dados obtidos são avaliados estatisticamente através da análise de variância, e as diferenças entre o grupo tratado e controle ao nível de significância quando $P \leq 0,05$.

4. ESTUDOS DE EFICÁCIA PARA HEMOPARASITICIDAS

4.1. Estudos controlado para Avaliação da eficácia Babesícida em Bovinos

A triagem dos animais deve ser realizada por testes sorológicos (reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático indireto (Elisa –teste) e moleculares específicos (reação em cadeia da polimerase (PCR convencional ou PCR em tempo real), para demonstrar a negatividade dos mesmos com relação a hemoparasitos, antes do experimento e após infecção experimental e tratamento. Os bovinos selecionados devem permanecer em áreas isoladas e teladas, sendo livres de carrapatos e moscas hematófagas, durante todo o período experimental.

Os bovinos (mínimo de 10, sendo 5 tratados e 5 controles), distribuídos em 2 grupos para cada hemoparasito, sendo que os animais devem ser submetidos à imunossupressão (esplenectomizados ou quimicamente imunossuprimidos). Os animais devem ser inoculados, via endovenosa, com

pelo menos 1×10^6 hemácias parasitadas, para cada espécie de babesia.

Hemoparasito	Infectados	Controle
<i>Babesia bovis</i>	5	5
<i>Babesia bigemina</i>	5	5
<i>Anaplasma marginale</i>	5	5

Para avaliação de eficácia babesicida, o parâmetro utilizado é a determinação da parasitemia por meio de esfregaço de sangue periférico, antes da administração do produto (12 e 24 horas) e a cada 12 horas após o tratamento, por um período mínimo de cinco dias. Não se detectando a presença do parasito, associando-se parâmetros clínicos e laboratoriais (testes moleculares e sorológicos), o grupo a ser infectado estará adequado. Após a infecção experimental dos animais com 1×10^6 hemácias parasitadas, acompanhar a parasitemia, devendo realizar esfregaços sanguíneos corados e contar em 40 campos microscópicos o número de hemácias parasitadas. Os exames físicos, hematócritos e hemograma devem ser realizados diariamente após o tratamento, até a ausência completa de hemoparasitos e a recuperação clínica dos bovinos.

Para babesicidas exige-se que o produto em avaliação apresente 90% de eficácia em até 72 horas após o tratamento.

4.2. Estudos controlado para avaliação da eficácia Anaplasmicida em Bovinos

Idêntico a triagem para o estudo com babesicidas, todos os animais destinados ao teste, devem ser negativos por técnicas diretas (esfregaço e PCR convencional ou PCR em tempo real) e indiretas.

Anteriormente a infecção experimental, devem ser submetidos à imunossupressão (esplenectomizados ou quimicamente imunossuprimidos). Os animais devem ser inoculados, via endovenosa, com pelo menos 1×10^6 hemácias parasitadas pelo *Anaplasma marginale*.

Para anaplasiose, a eficácia mínima exigida será de 80%, até 72h após o tratamento. Os exames físicos, hematócritos e hemograma devem ser realizados antes do experimento e diariamente, após a infecção e tratamento, até a eliminação da parasitemia e ausência de sinais clínicos compatíveis com anaplasiose.

Recomendações: a utilização de animais esplenectomizados deve ser devidamente justificada e previamente autorizada. Os animais destinados aos testes anaplasmicidas devem ser alojados em locais com isolamento e telados livres de carrapatos e moscas hematófagas.

4.3. Estudos controlado para avaliação da eficácia Babesicida e Theilericida em equídeos

Aplica-se o mesmo modelo experimental, bem como a quantidade de inóculo, relacionado à babesiose em bovinos, para cada espécie de hemoparasito. De acordo com o interesse de registro, os equinos ou asininos incluídos no estudo devem ser tratados com o produto quando apresentarem hipertemia e presença de hemácias parasitadas.

4.4. Estudos controlado para avaliação da eficácia Babesicida e Anaplasmicida em Caninos

Aplica-se o mesmo modelo experimental relacionados a babesiose em bovinos. Os caninos incluídos no estudo devem ser inoculados com *B. canis* (1×10^6 hemácias parasitadas) e tratados com o produto quando apresentarem hipertermia e presença de hemácias parasitadas.

4.5. Estudo controlado de eficácia para *Trypanosoma evansi*

A eficácia deve ser demonstrada para cada espécie a ser indicada para o produto. Pode-se optar pela adoção de estudo experimental ou estudo com animais naturalmente infectados. Dois grupos de seis animais (controle e tratado) devem ser empregados. Estes devem ser infectados com, no mínimo, 1×10^6 tripomastigotas de *T. evansi*, pela via endovenosa ou subcutânea. Deve-se acompanhar diariamente a parasitemia por, no mínimo, 60 dias, bem como realizar anotações dos sinais clínicos (febre, palpação de linfonodos, peso, consumo de alimento) individuais de todos os animais. No primeiro dia de detecção de tripomastigotas sanguíneas, deve-se realizar o tratamento nas doses indicadas.

Animais naturalmente infectados, cujo diagnóstico tenha sido comprovado por técnicas diretas de laboratório, podem compor os dois grupos experimentais. Recomenda-se 12 animais em cada um dos grupos. Técnicas moleculares (PCR) ou inoculação de sangue em rato (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar podem ser utilizadas quando não se detectar com facilidade os parasitas dos grupos experimentais após o tratamento.

A eficácia deve ser demonstrada por meio de negatividade em técnicas moleculares devidamente padronizadas. Após a não detecção da parasitemia na espécie-alvo, os testes moleculares devem ser realizados em três ocasiões quinzenalmente.

4.6. Estudo controlado de eficácia para *Trypanosoma vivax*

Ruminantes da espécie-alvo devem ser utilizados em número de 6 animais por grupo (tratado e controle). Estes devem ser infectado com, no mínimo, 1×10^6 tripomastigotas de *T. vivax* pela via endovenosa ou subcutânea. Deve-se acompanhar diariamente a parasitemia pela técnica de Woo por, no mínimo, 60 dias, bem como realizar anotações dos sinais clínicos (febre, palpação de linfonodos, peso, consumo de alimento) individuais de todos os animais. No primeiro dia de detecção de tripomastigotas sanguíneas, deve-se realizar o tratamento nas doses indicadas.

A parasitemia deve ser realizada diariamente antes e após o tratamento por um período mínimo de 60 dias. Sinais clínicos devem ser anotados, conforme indicado acima. Técnicas moleculares (PCR) podem ser utilizadas quando não se detectar com facilidade os parasitas dos grupos experimentais após o tratamento.

A eficácia deve ser demonstrada por meio da negatividade por técnicas moleculares. Após a não-deteção da parasitemia na espécie-alvo, a negatividade dos animais deve ser comprovada por três resultados quinzenais negativos de PCR e em uma prova biológica com inoculação em cabritos jovens. Os animais controle (infectado e não tratado) devem ser avaliados nos mesmos momentos de avaliação do grupo tratado.

4.7. Estudo controlado para a avaliação da eficácia giardicida em cães e gatos

Deve-se empregar um mínimo de doze cães ou gatos naturalmente parasitados por *Giardia sp.*. Exames de fezes devem ser efetuados para a confirmação das infecções (Método de Faust) antes e após o tratamento. Os exames devem ser efetuados em amostras de fezes dos dias -3, -2, -1 (antes do tratamento) e nos três dias subsequentes. Serão considerados negativos os animais que não apresentarem cistos em nenhum dos três exames consecutivos pós-tratamento. A fórmula para cálculo da eficácia é: $[(\text{número de animais positivos para cistos antes do tratamento}) - (\text{número de animais positivos para cistos após o tratamento}) / (\text{número de animais positivos para cistos antes do tratamento})] \times 100$.

5. ESTUDO CONTROLADO DE EFICÁCIA PARA *Isospora sp.* EM SUÍNOS

Dois grupos com um mínimo de 10 leitões em cada, com idade de três dias, devem ser infectados pela via oral, com no mínimo 100.000 oocistos esporulados de *I. suis*, provenientes de cepas nacionais recentemente isoladas. O grupo tratado deve receber o tratamento de acordo com as recomendações incluídas em bula. Após a confirmação da infecção experimental, todos os animais devem ser monitorados diariamente por no mínimo 28 dias quanto aos fatores, diarreia, peso corporal, e quantidade de oocistos eliminados nas fezes. Deve-se adotar procedimentos de suporte (hidratação e antidiarreicos sem efeito terapêutico sobre *Isospora sp.*), de modo que os animais sejam mantidos em boas condições clínicas durante todo o experimento. Ao final do experimento, os animais serão submetidos à eutanásia e necropsia. Serão coletados fragmentos do intestino delgado que devem ser fixados em formalina a 10%. Cortes histológicos devem ser efetuados e o material corado pela hematoxilina-eosina, para comparação, através de escores, do grau de hipertrofia das vilosidades intestinais entre o grupo controle e tratado. A eficácia do tratamento será avaliada através da comprovação por análise estatística adequada, de diferença significativa estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre os parâmetros eliminação de oocisto, presença de diarreia, peso e escore de lesões dos grupos tratado e controle.

6. ESTUDOS PARA OUTRAS INDICAÇÕES DE PARASITICIDAS

A inclusão de eficácia parasiticida cujo patógeno ou espécie animal não tenha sido contemplado neste Anexo, requer submissão de protocolo específico para avaliação

Para novas moléculas, cujas características e mecanismo de ação impliquem em metodologias de ensaio e avaliação que não estejam contempladas neste Regulamento, a metodologia proposta pelo interessado deverá ser embasada por meio de estudos cientificamente comprovados.



Documento assinado eletronicamente por **LUNA LISBOA ALVES, Coordenador(a) de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário**, em 27/01/2020, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sistemas.agricultura.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **8885840** e o código CRC **B66AB1CE**.