

Fundação Universidade Federal do Rio Grande

Programa de Pós-graduação em Aqüicultura

Desenvolvimento, caracterização e infecção experimental de anisquídeos

(Anisakidae: Nematoda) em laboratório

Viviane Barquete

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aqüicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Joaber Pereira Junior

Co-orientador: Prof. Dr. José Guilherme Bersano Filho

Rio Grande, RS

Fevereiro de 2006

ÍNDICE

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Introdução.....	01
Material e métodos.....	03
Experimento de eclosão dos ovos de Nematoda	03
Infecção experimental em copépodes.....	05
Infecção experimental em peixes.....	07
Resultados.....	08
Experimento de eclosão dos ovos.....	08
Infecção experimental em copépodes.....	09
Infecção experimental em peixes.....	09
Discussão.....	10
Literatura citada.....	15
Figuras e Tabelas.....	22

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Joaber Pereira Junior, pela orientação, dedicação e paciência durante a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Bersano Filho (Duda), pela orientação e dicas com o cultivo dos copépodes.

Ao Prof. Dr. Flávio Ruas, pela participação na banca, e dicas para a melhoria do trabalho.

Ao CNPq pela concessão de bolsa durante a realização do trabalho.

Ao pessoal da EMA, professores e funcionários, que me auxiliaram durante o trabalho; ao Sampaio e ao Ricardo Robaldo, que me auxiliaram no experimento com os peixes!

Ao meu amigo Francis, um agradecimento especial, pois sem ele, este trabalho não teria acontecido! Valeu pela amizade, dias no laboratório e paciência!

À Juliana Barros, que acompanhou todo o estudo durante estes dois anos! Sem sua ajuda, seria difícil realizar este trabalho!

À Ieda, por ser a “mãe” da galera do laboratório. Obrigada pela sua ajuda e pelo seu carinho.

Aos amigos do laboratório de Ictioparasitologia: Tati, Eduardo, Juliana, Neila, Ana Luiza, Antônio e Natália.

Aos colegas do Mestrado, principalmente ao Tagor e Alessandro, ao Waldemar do laboratório de Zooplâncton que muitas vezes me auxiliaram com o cultivo de copépodes.

Aos amigos e ornitólogos de plantão, Fernanda, Carmem, Caio, ao pessoal do CRAM – Andréa e Alice, pela incansável busca de parasitos nas aves.

Aos amigos que de uma forma ou de outra, me apoiaram e me incentivaram na realização deste trabalho: as Spices 98, Cris, Fabi, Kido, Rosi, Michel, Evandro, Billot, Letícia, Rafa, Edu, Cassi, Franciene, Jojoca e Jorge. Obrigado pelos e-mails, telefonemas, companhia e carinho.

Aos meus pais, Edgar e Marina, aos meus irmãos Edgar e Simone por todo apoio e incentivo!

RESUMO

Com o objetivo de reproduzir parte do ciclo de vida de nematóides em laboratório, foram coletados helmintos do pró-ventrículo de um espécime de Bobo-pequeno (*Puffinus puffinus*). Esta ave foi encontrada morta na praia, costa sul do Brasil. Ovos de *Contracaecum pelagicum* foram incubados em água salgada a 21°C, e após 60 h iniciaram a eclosão. Vinte e quatro horas após o início da eclosão, 96,3% dos ovos haviam eclodido com larvas no estágio L3. Foi constatada diferença significativa no comprimento total das larvas entre o momento da eclosão e 60 horas de vida. Ovos de *Contracaecum spiculigerum* foram obtidos de um espécime de pingüim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), encontrado morto na praia. Copépodes *Acartia tonsa* criados em laboratório foram expostos a ovos e/ou larvas destes nematóides, e foram infectados. As larvas L3 de *C. spiculigerum* se alojaram na hemocele destes crustáceos. Durante sete dias de experimento, foi constatada diferença significativa no comprimento total das larvas retiradas dos copépodes, entre o dia 1 e dia 7 pós-infecção. As larvas não apresentavam mais a cutícula externa (“capa”) do estágio L2. As larvas de *C. spiculigerum* e *C. pelagicum* eclodiram em L3, o que difere do observado em outros estudos, sugerindo que as larvas de anisquídeos emergiram do ovo em L2. Linguados *Paralichthys orbignyanus* com dois anos, criados em laboratório foram inoculados com uma solução contendo larvas em L3 de *C. pelagicum* sem sucesso na infecção. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a necessidade de novos estudos para desenvolver estratégias de manejo preventivo, contribuindo para a valorização no produto final da aqüicultura e os benefícios para a saúde pública.

Palavras-chave: parasitos, nematóides, copépodes, peixes, infecção experimental.

ABSTRACT

The main goal of this study is to reproduce the life cycle of nematodes in laboratory. The helminthes were collected from Manx Shearwater (*Puffinus puffinus*) proventriculus. This beached bird was collected from the Southern Brazilian coast. The eggs of the parasitic nematode *Contracaecum pelagicum* were incubated in seawater at 21°C and hatched after 60 hours. The percentage of eggs that hatched was 96.3% in 24 hours. The larvae L3 emerged from the egg and the total length differed significantly when they hatched and 60 hours that they were maintained alive. Eggs of *Contracaecum spiculigerum* were obtained from one beached Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). Free-swimming ensheathed third-stage larvae of *C. spiculigerum* were shown experimentally to be ingested by the copepods (*Acartia tonsa*) reared in the laboratory. The larvae L3 have established, grew in the copepods hemocoel, and lost the second-stage cuticle. During the experiment the larvae total length differed significantly between 1 day and 7 days pos-infection. The larvae L3 of *C. pelagicum* and *C. spiculigerum* emerged from the egg, which do not agree with the results of other studies that highlighted that the L2 emerge from the egg. Flounders (*Paralichthys orbignyanus*) reared in the laboratory were inoculated with *C. pelagicum* larvae solution with seawater, but they were not infected. The results obtained in present the present study shows the necessity of new researches to develop preventive management strategies for aquaculture, which contribute to valorization of aquaculture final product and benefiting the public health.

Keywords: parasites, nematodes, copepods, fish, experimental infection.

INTRODUÇÃO

Parasitismo é uma estreita relação inter-específica entre organismos, onde um, o parasito, depende e causa prejuízo para o outro, considerado hospedeiro (Overstreet 1978). Muitos parasitos infectam organismos marinhos, diminuindo seu valor comercial e eventualmente interferindo na estrutura de suas populações. Podem causar mortalidade em massa, e ser transmitidos de animais marinhos para o homem (Rohde 1982).

Os nematóides são parasitos frequentes em peixes, sendo fácil encontrar mais do que uma espécie num mesmo hospedeiro (poliparasitismo). Esses animais podem ser ovíparos ou larvíparos e seu desenvolvimento compreende quatro estádios larvais e fase adulta. Quase todas as espécies de nematóides parasitas necessitam de hospedeiros intermediários, que podem ser representados por invertebrados, como oligoquetas, larvas de insetos, e com muita frequência crustáceos (Eiras 1994), ou mesmo vertebrados como os peixes. Nematóides Anisakidae são cosmopolitas, parasitam principalmente organismos aquáticos (Moravec *et al.* 1985), e utilizam como hospedeiro intermediário organismos zooplanctônicos (Jackson *et al.* 1997).

A ingestão de peixe cru ou mal cozido, contaminado por larvas de anisquídeos, pode resultar numa enfermidade denominada anisquidose (Iglesias *et al.* 1997; Ubeira *et al.* 2000). A ocorrência desta zoonose aumentou nas últimas décadas em função da globalização de hábitos culinários, até então restritos a poucas partes do mundo (McCarthy & Moore 2000; Thompson 2001). Diversos autores têm demonstrado a presença de anisquídeos em peixes e cefalópodes consumidos pelo homem (Deardorff & Overstreet 1982; Carvajal & Cattán 1985; Moravec *et al.* 1985; Carvajal & González 1990; González & Carvajal 1995; Nagasawa & Moravec 1995; Sardella & Timi 1996; González 1998; Gonzáles & Kroeck 2000; Schmidt *et al.* 2003). Isso evidencia a importância desses parasitos para a saúde pública, considerando que o homem pode estar entre seus hospedeiros definitivos (Ubeira *et al.* 2000).

A anisquidose pode ser gástrica, intestinal, extra-gastrointestinal, heteróloga e ecotópica, dependendo do local de assentamento da larva, com manifestação aguda ou crônica que podem incluir dores abdominais, vômitos, febre e diarreia. A forma aguda

pode ser tratada por técnicas endoscópicas ou por antibióticos, anticolinérgicos e corticoesteroides quando a larva se localiza no estômago, duodeno e cólon. Na forma crônica é recomendada a execução de um corte parcial da zona afetada para evitar a exacerbação alérgica da lesão (Ubeira *et al.* 2000).

Além dos riscos para a saúde pública, estes nematóides podem causar danos nas fazendas de criação de peixes. Segundo González (1998), a presença de *Hysterothylacium aduncum* juntamente com as doenças microbianas nos salmonídeos implica em prejuízos, pois representa um maior custo de energia para os hospedeiros, e como consequência, perdas para as indústrias. Segundo Carvajal & Cattán (1985), os procedimentos de manejo para a remoção de parasitos em peixes, aumentam o custo do produto final. Mesmo em fazendas de criação, onde os peixes são alimentados com ração, as chances de infecção por helmintos não são nulas. A infecção ocorre principalmente em áreas onde é mantida a relação presa/predador (Carvajal & González 1990), ou seja, em criações que ocorrem no próprio ambiente como tanques-rede e cercados.

Devido às dificuldades intrínsecas em estudar ciclos de vida de parasitos, especialmente os marinhos, a biologia da maioria destes organismos continua pouco esclarecida (Jackson *et al.* 1997). A identificação precisa do parasito e sua caracterização, em seus diferentes estádios de desenvolvimento, tem importantes implicações para o estudo da epidemiologia do helminto e resolução dos problemas taxonômicos (Kijewska *et al.* 2002). Para elucidar o ciclo de vida de alguns ascaridídeos, estudos sobre infecções experimentais em copépodes e peixes foram realizados e mostraram resultados relevantes sobre os estádios de vida das larvas dos helmintos (Huizinga 1966; Smith 1984, Smith *et al.* 1990; Køie & Fagerholm 1995; Køie 2001).

A importância e os eventuais prejuízos que parasitos causam no cultivo de peixes, podem se manifestar de várias maneiras onde são destacadas: 1) redução do número de peixes ou mesmo mortalidade em massa nas populações hospedeiras; 2) alterações dos órgãos reprodutivos e redução da fertilidade, e consequentemente o tamanho da população; 3) redução do peso do peixe e consequentemente diminuição no

crescimento; 4) dificuldade de comercialização do peixe e/ou aumento de seu custo (Rohde 1989).

Dentro deste contexto, é importante para a aquicultura o estudo de ciclos de vida de parasitos, pois possibilitam caracterizar os estádios infectantes dos helmintos, sua morfologia e exigências biológicas. Isso poderá permitir a definição de estratégias que reduzam as perdas advindas da infecção.

OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo principal, reproduzir em laboratório parte do ciclo de vida de *Contracaecum* sp. As informações resultantes deste trabalho poderão ser utilizadas para o desenvolvimento de um protocolo de trabalho experimental para estudo de nematóides parasitas de peixes e outros organismos de interesse na aquicultura.

Objetivos específicos

- Determinar o período de eclosão dos ovos de *Contracaecum pelagicum*;
- Descrever ovos e larvas de *Contracaecum pelagicum*;
- Realizar infecção experimental em copépode *Acartia tonsa* utilizando larvas de *Contracaecum spiculigerum*;
- Realizar infecção experimental em linguado *Paralichthys orbignyanus* utilizando larvas de *Contracaecum pelagicum*.

MATERIAL E MÉTODOS

1.0. Experimento de eclosão dos ovos de Nematoda *Contracaecum pelagicum*

1.1. Obtenção e remoção dos ovos

Os ovos foram obtidos a partir de seis fêmeas adultas de *Contracaecum pelagicum* retiradas do pró-ventrículo de um bobo-pequeno (*Puffinus puffinus*) (Procellariidae)

coletado morto na praia do Cassino, RS, em novembro de 2004. Os helmintos obtidos foram mantidos em solução salina a 0,9% em temperatura ambiente conforme protocolo de Amato *et al.* (1991). Para garantir que os ovos utilizados pertenciam todos à mesma espécie, antes de removê-los, os helmintos foram observados sob microscópio e/ou microscópio estereoscópico.

A remoção dos ovos foi feita de acordo com Højgaard (1998) modificado. Fragmentos de fêmeas ovadas foram colocados num agitador eletrônico por 10 minutos, com solução salina 0,9% para que os ovos fossem liberados do útero. A “sopa” de nematóides obtida foi peneirada em malha de 100 μm para passagem dos ovos e retenção dos restos dos nematóides. Em seguida, a solução salina contendo os ovos foi filtrada em malha de 30 μm para que os ovos fossem retidos e transferidos para um becker. Os ovos foram diluídos em 200 mL de água do mar (S = 30) filtrada (1 μm), autoclavada, e posteriormente quarteadas até a obtenção de 8 alíquotas equivalentes a 12,5 mL. Estas parcelas foram individualizadas em placas de Petry de 48 mm de diâmetro, cobertas com papel alumínio e mantidas a uma temperatura média de 22,7°C ($\pm 2,7^\circ$) numa estufa incubadora tipo B.O.D.

1.2 . *Contagem inicial do número de ovos*

O número de ovos em cada uma das seis placas foi estimado com auxílio de um retículo (1x1 mm), colocado sob o fundo das placas de Petry, e uma lupa estereoscópica. A quantidade de ovos foi estimada pela contagem de 25 quadrados, escolhidos aleatoriamente, e o valor médio contado foi multiplicado pelo número total de quadrados (1808). O número total de ovos foi obtido pela soma da quantidade de ovos estimado em cada placa.

1.3. *Fixação de ovos e larvas*

Para a caracterização dos ovos e larvas, foram feitas observações e fixação de espécimes em intervalos de 12 horas. Os ovos e/ou larvas foram fixados em AFA (álcool, formol e ácido acético) por 48 horas e conservados em etanol 70° GL, com 5 a 10% de glicerina, segundo Amato *et al.* (1991). Para cada amostra fixada foram

confeccionadas lâminas semipermanentes em lactofenol de Aman utilizadas para desenhos e medidas.

1.4. *Determinação do período de eclosão*

Durante o período de eclosão a água não foi trocada para evitar a perda de ovos. Para determinar o período de eclosão foram feitas observações em intervalos de 12 horas. O início da eclosão foi considerado quando ocorreu pela primeira vez a presença de larvas nas placas. O fim foi determinado quando não foi verificado aumento do número de larvas.

1.5. *Sucesso de eclosão*

O sucesso de eclosão foi determinado pela contagem direta de larvas vivas em seis placas de Petry, como descrito anteriormente. A partir do início da eclosão dos ovos as contagens foram feitas em intervalos de três horas num período de 24 horas.

1.6. *Análise estatística*

Para verificar a ocorrência de diferença significativa no comprimento total das larvas desde a eclosão até 60 horas pós-eclosão, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. Foi utilizado o teste não paramétrico, pois os dados não atenderam as exigências do teste paramétrico (normalidade, homocedasticidade e correlação entre as médias).

2.0. Infecção experimental em copépodes

2.1. *Obtenção de ovos e larvas de nematóides*

As fêmeas de nematóides (*Contracaecum spiculigerum*) foram retiradas de um pingüim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (Sphenescidae) coletado morto na praia, na costa sul do Brasil. Foram utilizados 15 nematóides e o procedimento de retirada dos ovos foi o mesmo descrito no item 1.1. A contagem inicial dos ovos foi efetuada da mesma maneira descrita no item 1.2. Aproximadamente 288.520 ovos foram diluídos em 120 mL de água salgada (S = 35) autoclavada, contendo aproximadamente 1 mL de lincomicina (1 mL de lincomicina: 100 mL de água). Os

ovos imersos nesta solução em um Erlenmayer coberto com papel alumínio, foram colocados numa estufa incubadora do tipo B.O.D, a 20°C ($\pm 0,3$) durante cinco dias.

2.2. Cultivo de copépodes

Os copépodes (*Acartia tonsa*) utilizados no experimento foram obtidos a partir de cultivos intensivos de 500 L mantidos na Estação Marinha de Aquicultura (EMA) através do método de Bersano (2003). Este método permite uma fácil separação entre os ovos e copépodes adultos. Os ovos de *A. tonsa* produzidos no mesmo dia, foram coletados e transferidos para tanques plásticos atóxicos com volume de 60 L, e cultivados por 10 dias. Os copépodes foram alimentados diariamente com uma mistura das microalgas *Thalassiosira fluviatilis* (10^3 células mL⁻¹) e *Isochrysis galbana*. (10^5 células mL⁻¹). Durante o experimento (10 dias) a temperatura da água foi mantida entre 18-21°C pelo uso de aquecedores com termostato e o fotoperíodo ajustado para 12 horas de luz diárias. A densidade de estocagem foi mantida em torno de 400 copépodes L⁻¹ e a aeração constante e moderada.

2.3. Infecção experimental

Para a infecção experimental em copépodes (*A. tonsa*) por ovos e larvas de nematóides (*C. spiculigerum*) foram utilizados aproximadamente 4.000 indivíduos em estágio copepodito V e adultos. Estes copépodes foram colocados em tanque cilíndrico de 60 L contendo 20 L de água salgada (S = 30), e permaneceram sem alimento por seis horas. Este procedimento foi utilizado para aumentar as chances de ingestão de ovos e/ou larvas de nematóides pelos crustáceos. Decorrido este período, a solução contendo ovos e larvas de nematóides foi adicionada ao tanque de cultivo. Os copépodes foram alimentados diariamente com *I. galbana* (60.000 células/mL), única alga disponível na ocasião, a partir do dia seguinte à infecção. Este cultivo foi mantido com 20 L de água, e no escuro durante três dias. No quarto dia (denominado dia 1 pós-infecção), foram acrescidos 30 L de água, permanecendo com 50 L por mais sete dias até o fim do experimento, com fotoperíodo de 12 horas de luz. Após o dia 1 pós-infecção, amostras diárias (aproximadamente 100 copépodes) foram fixadas solução de formoldeído a 4% para posterior análise em laboratório. Durante o experimento, não houve troca do

volume total de água para evitar perda de ovos e larvas de nematóides. Os índices parasitológicos, prevalência, intensidade média de infecção e abundância média *sensu* Bush *et al.* (1997) foram calculados pelo programa Quantitative Parasitology (Rozsa *et al.* 2000). Para verificar a ocorrência de diferença significativa no comprimento total das larvas retiradas dos copépodes infectados, foi aplicado o teste ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.

3.0. Infecção experimental em peixes

3.1. Obtenção do linguado Paralichthys orbignyanus

Os linguados necessários para o experimento foram fornecidos pelo Laboratório de Maricultura da EMA. Estes peixes foram desenvolvidos em cativeiro e possuíam aproximadamente dois anos de vida, com o comprimento total variando de 15 a 25 cm. Foram mantidos em tanques de fibra, hexagonais, com paredes e fundo pretos, com 1500 L de água do mar filtrada, com renovação diária mínima de 80%. A água foi mantida a temperatura ambiente, com 24 horas de luz.

A qualidade de água foi mantida mediante o acompanhamento diário da temperatura, fotoperíodo, salinidade e pH. A alimentação foi oferecida aos linguados *ad libitum*, três vezes ao dia, sendo constituída de itens componentes da dieta natural da espécie. Foram utilizados juvenis de Papa-terra (*Menticirrhus littoralis*) e adultos de Maria-luiza (*Paralanchurus brasiliensis*) (Robaldo R.B. com. pess.). Os peixes oferecidos como alimento, foram lavados e congelados, e no momento da alimentação estes peixes foram eviscerados, e somente a musculatura picada foi oferecida.

3.2. Infecção experimental direta de linguados por larvas L3 de Contracaecum pelagicum

Foram utilizados 60 linguados sendo que um grupo “testemunho” de 10 peixes foi previamente necropsiado, para certificar que estavam negativos para o parasito em estudo. Um segundo grupo “controle” composto por 10 indivíduos foi necropsiado no dia do início do experimento, que teve a duração de cinco semanas e foi realizado no Laboratório de Maricultura da EMA.

Os peixes submetidos à infecção foram anestesiados individualmente com benzocaína numa concentração de 50 ppm. Permaneceram anestesiados por aproximadamente 5 minutos, e neste intervalo de tempo foram injetadas de 500 a 600 larvas de *C. pelagicum* imersas em 1 mL de água salgada. Este procedimento foi realizado com o auxílio de uma seringa hipodérmica, sem agulha, acoplada a uma cânula de silicone posicionada no esôfago, onde as larvas foram introduzidas sob pressão para dentro do estômago. Os cinco primeiros peixes infectados foram mantidos separados dos outros, pois foram necropsiados 24 h pós-infecção. Os 35 peixes restantes foram mantidos juntos, nas mesmas condições anteriores, e necropsiados em grupos de cinco espécimes, em 48 e 72 horas e, 1, 2, 3, 4 e 5 semanas pós-infecção.

RESULTADOS

1.0. Experimento de eclosão de ovos de *Contracaecum pelagicum*

Descrição e desenvolvimento dos ovos

Os ovos de *Contracaecum pelagicum* são esféricos, com diâmetro médio de 0,056 mm envoltos por duas camadas transparentes: (1) uma externa e fina com discreta rugosidade, e (2) uma interna com membrana do vitelo (Figura 01). Na água salgada, possuíam a tendência de afundar, isto é, ficavam depositados no fundo da placa de Petry durante o experimento. No início do processo de incubação foi possível observar no interior dos ovos o embrião em estágio inicial de desenvolvimento não definido (Figura 02). Após 24 horas de incubação, algumas larvas já eram visíveis dentro dos ovos (Figura 03). Com 48 horas de incubação (i.e., 12 horas antes da eclosão) as larvas estavam bem diferenciadas e evidentes (Figura 04).

Sucesso de eclosão

O número total de ovos estimado foi de 47.441 ovos. A eclosão teve início 60 horas após a incubação, com duração média de 24 horas. Os ovos de todas as réplicas começaram a eclodir quase simultaneamente. No momento em que foi registrado o início da eclosão (0 h), 34% dos ovos já haviam eclodido. Nas primeiras 12 horas

ocorreu um elevado aumento do número de larvas (90,2%) e em 24 horas a eclosão foi de 96,3% (Figura 05).

Desenvolvimento das larvas

A larva de *C. pelagicum* eclodiu em estágio larval 3 (L3), caracterizada pela dupla cutícula. A primeira cutícula (L1) provavelmente foi perdida no momento da eclosão e a cutícula externa foi interpretada como sendo do estágio L2. Possuíam a cauda cônica e terminada em ponta, e o trato digestivo era discretamente distinguível (Figura 06). O comprimento total médio das larvas em 60 horas foi de 0,32 mm ($\pm 0,03$) e em 120 horas foi de 0,36 mm ($\pm 0,01$). Foi constatada diferença significativa no comprimento total das larvas (Kruskal-Wallis, $H = 23,03$, $gl = 5$, $p = 0,0003$), e no tempo em que foram mantidas vivas (60 horas pós-eclosão), continuaram no estágio larval 3 (Figura 07).

2.0. Infecção experimental em copépodes *Acartia tonsa*

Os copépodes *A. tonsa* foram infectados por ingestão de ovos contendo larvas infectantes (L3) ou larvas livres em L3 de *Contracaecum spiculigerum*. Durante o experimento foi possível observar, larvas em movimento na hemocele dos copépodes. Nos dias 1 e 2 pós-infecção foram constatados copépodes infectados por ovos e larvas (Figura 08), e nos dias restantes, somente por larvas (Figura 09). A maior prevalência ocorreu no dia 5 com 21,2%, e a menor no dia 7 com 7,8%, e (Tabela 01). As larvas retiradas dos copépodes infectados já não apresentavam a dupla cutícula, e foram caracterizadas como L3 (Figura 10). O comprimento médio das larvas foi de 0,32 mm do dia 1 pós-infecção e 0,39 mm no dia 7 pós-infecção. Foi constatada diferença significativa no comprimento total entre as larvas do dia 1 e do dia 7 (ANOVA One-way, $p = 0,01$).

3.0. Infecção experimental em linguado vermelho *Paralichthys orbignyanus*

Não foram detectadas larvas de *C. pelagicum* nos peixes experimentalmente infectados quando expostos diretamente às larvas em estágio L3. Durante o experimento, não foi constatado alterações comportamentais ou mortalidade dos peixes.

DISCUSSÃO

Alguns anisacídeos como *Contracaecum* spp., que utilizam aves piscívoras como hospedeiro final podem apresentar diferenças em relação à forma e ao tamanho de seus ovos. Ovos de *C. spiculigerum* descrito por Hiuzinga (1966) são discretamente ovalados com 58 x 64 µm. Ovos de *C. eudyptulae* são esféricos, porém, menores, com diâmetro variando entre 25 - 30 µm (Johnston & Mawson 1942), os de *C. bancrofti* são subglobulares com 54 x 58 µm (Johnston & Mawson 1941). Já os ovos de *C. osculatum* coletado de mamíferos marinhos no Ártico (Davey 1969, Bratney 1990), são maiores, com 73 x 82 µm. Os ovos de *C. pelagicum*, descrito neste trabalho, são esféricos, com diâmetro de 56 µm. Essas diferenças são caracteres taxonômicos específicos importantes, e muitas vezes, permitem o diagnóstico clínico por exame de fezes em seus hospedeiros, sem o uso de técnicas invasivas.

O tempo de desenvolvimento dos ovos desde sua retirada do útero das fêmeas até o momento da eclosão, sofre influência da temperatura e luminosidade (Højgaard 1998). Segundo Køie *et al.* (1995), à 6° C, o período de eclosão de *Anisakis simplex* foi de três a quatro semanas e em *Pseudoterranova decipiens* à 20°C foi de oito dias. Segundo Huizinga (1966), ovos de *C. spiculigerum* à 21°C, eclodiram depois de cinco dias de incubação. Num experimento prévio realizado para este estudo, no qual foram utilizados ovos de *Contracaecum* sp. retirados de pingüim-de-Magalhães em avançado estado de decomposição, a eclosão ocorreu após três dias e 12 horas à 20°C (J. Barros, dados não publicados). Os ovos de *C. pelagicum*, neste estudo eclodiram com dois dias e 12 horas de incubação. Considerando as diversas condições que os helmintos foram expostos antes da coleta, as diferenças nos períodos de eclosão podem ser atribuídas aos diversos estádios de desenvolvimento em que os ovos se encontravam no útero das fêmeas. A temperatura média mais elevada (22,7°C), quando comparada com a temperatura dos estudos supracitados, foi um fator que possivelmente contribuiu para acelerar o desenvolvimento dos ovos de *C. pelagicum*. Em adição, o sucesso de eclosão em ambos os experimentos foi elevado (acima de 80%), o que demonstra que mesmo nematóides retirados de organismos em avançado estado de decomposição, podem ter

ovos viáveis. Com base nesta observação infere-se que essa seja uma estratégia apresentada por estes helmintos, para aumentar as chances de sucesso em sua dispersão.

Geralmente os nematóides possuem seis estádios de desenvolvimento, definido como ovo, quatro estádios larvais de L1 a L4, e adulto (Eiras 1994). No presente trabalho, os ovos de *C. pelagicum* e *C. spiculigerum* eclodiram em L3. Segundo Huizinga (1966), *C. spiculigerum* eclode em L2, porém as características das larvas descritas pelo autor, são semelhantes às das larvas observadas neste estudo. Diversos autores também reportaram para outros ascaridídeos como *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* e *Raphidascaris acus* que a larva emerge em L2 (Smith 1983, Smith 1984, Bratney & Clark 1992). Contudo, outros estudos com *C. osculatum* (Køie & Fagerholm 1993), *Hysterothylacium aduncum* (Køie 1993; Balbuena *et al.* 1998; González 1998), *A. simplex* e *P. decipiens* (Køie *et al.* 1995) revelaram que a larva eclode em L3. De acordo com Smith *et al.* (1990), o primeiro e o segundo estágio larval (L1 e L2) podem reter a cutícula sucedendo o estágio L3, formando uma “capa” ou dupla cutícula. Caso ocorram duas mudas dentro do ovo, eclodirá uma larva em L3 envolta por esta capa. Isto corrobora os resultados obtidos aqui, de que as larvas eclodem em L3. Esses dados também sugerem que provavelmente as larvas referidas pelos autores citados acima, também tenham eclodido em L3 ao invés de L2.

As L3 de *C. pelagicum* possuem características semelhantes às larvas de *C. spiculigerum* e *H. aduncum* como descrito por Huizinga (1966), Køie (1993) e Balbuena *et al.* (1998). As larvas dessas espécies apresentam o comprimento total próximos a 0,32 mm, dente de perfuração na porção anterior, cauda cônica terminada em ponta, e o trato digestivo parcialmente diferenciado (Huizinga 1966; Køie 1993; Balbuena *et al.* 1998). Entretanto, outros ascaridídeos apresentam as mesmas características, diferindo apenas no comprimento total (Davey 1969, Bratney 1990). As larvas de *C. pelagicum* durante o tempo em que permaneceram vivas (60 horas pós-eclosão) apresentaram um discreto, porém significativo crescimento. É possível questionar se este crescimento ocorreu de fato, ou se seria decorrente do movimento das larvas, pois segundo Køie *et al.* (1995) o movimento causa um alongamento da cutícula e conseqüentemente aumento no seu comprimento total.

Num estudo de infecção experimental com larvas de *C. spiculigerum* em *Cyclops vernalis*, os copépodes ingeriram a larva (L2?) e 15 minutos depois estas penetraram na hemocele do hospedeiro (Huizinga 1966). Os copépodes *A. tonsa* do presente estudo foram infectados com larvas (L3) de *C. spiculigerum* que também se alojaram na hemocele do hospedeiro, e quando retiradas dos copépodes, não apresentaram a dupla cutícula. De acordo com Køie & Fagerholm 1995 e Køie *et al.* 1995, larvas de *A. simplex*, *P. decipiens*, *H. aduncum* e *C. osculatum* provavelmente perdem a cutícula de L2 pela manipulação das peças bucais, quando ingeridas por crustáceos, o que permite que a larva penetre no intestino antes de se estabelecer na hemocele. Possivelmente isto ocorra com a maioria dos ascarídeos em seu primeiro hospedeiro, pois segundo Huizinga (1966), as larvas com dupla cutícula não podem se alimentar, e seu tempo de sobrevivência depende do metabolismo dos tecidos de reserva.

Huizinga (1966) e Køie & Fagerholm (1995) detectaram um discreto crescimento nas larvas de *C. spiculigerum* e *C. osculatum* retiradas de *C. vernalis* e *A. tonsa*, respectivamente, uma semana pós-infecção. O crescimento da larva também observado neste trabalho corrobora as observações anteriores de aumento no comprimento da larva dentro do seu primeiro hospedeiro. Porém, Davey (1969) não detectou crescimento de *C. osculatum*, dentro do hospedeiro. De acordo com Køie (2001), se a larva não desenvolveu ou cresceu no comprimento total dentro do copépode, esse provavelmente atue como um hospedeiro transporte. Porém, mesmo encontrando um discreto aumento no tamanho das larvas no presente trabalho, é difícil afirmar se *A. tonsa* age como hospedeiro paratênico ou intermediário. Somando o fato de que Køie & Fagerholm (1995) indicaram que os copépodes atuam como hospedeiro paratênico para larvas de *C. osculatum*, mesmo estas tendo apresentado um discreto crescimento.

Num estudo em laboratório, depois de sete dias de pós-infecção, Køie (2001) observou prevalência de 60% de *A. simplex* em *A. tonsa* e com esse elevado valor, sugeriu que estes crustáceos também adquirem as larvas em condições naturais. Por outro lado, no presente estudo, embora as prevalências não tenham sido tão elevadas, isso não significa que esta infecção não ocorra em condições naturais. A mortalidade de copépodes durante o período experimental, pode ser uma hipótese para a prevalência ter diminuído no último dia de experimento. Para verificar se *A. tonsa* é infectada por *C.*

spiculigerum em condições naturais, são necessários estudos que examinem estes crustáceos no ambiente.

Larvas de *Contracaecum* spp. podem infectar peixes por duas vias: direta, ingerindo a larva infectante e, indireta, por ingestão de copépodes infectados (Huizinga 1966). Vários estudos com infecção experimental em peixes por anisacídeos foram realizados, com resultados positivos (Huizinga 1966; Smith *et al.* 1990; Køie 1993; Køie & Fagerholm 1995; González 1998; Balbuena *et al.* 2000; Køie 2001; Bergmann & Motta 2004) e outros negativos (Smith *et al.* 1990; Køie 1993; González 1998). Num experimento de infecção de *C. spiculigerum* em guppy (*Lebistes reticulatus*) foi constatado que a maioria das larvas apresentava a cutícula de L2, estava morta e foi eliminada nas fezes dos peixes. Køie & Fagerholm (1995) infectaram o Solha-das-pedras *P. flesus* (11-12 cm) com copépodes *A. tonsa* infectados por larvas de *C. osculatum*. Seis meses depois, as larvas foram encontradas encapsuladas na parede do intestino, mesentério e fígado.

O resultado negativo na tentativa de infecção do linguado *P. orbygnianus* por *C. pelagicum* neste estudo, pode estar relacionado ao comprimento total e/ou idade das larvas. Segundo Køie (1993), a larva (L3) de *H. aduncum* infecta peixes depois de crescer em um ou mais hospedeiros intermediários, pois necessita de maturidade fisiológica. Outra hipótese que pode ser inferida seria de que o peixe não é o primeiro hospedeiro intermediário do parasito como sugere González (1998). Há de se considerar ainda, a possibilidade de que o peixe tenha regurgitado a solução contendo larvas de nematóides durante sua manipulação, como observado no presente estudo, ou quando se recuperava da anestesia. Outro fator a ser considerado é a idade e o tamanho dos peixes. Os linguados utilizados tinham cerca de dois anos de idade, e um comprimento variando entre 15 e 25 cm. Estes peixes eram denominados “anões” na estação de maricultura, devido ao seu pequeno tamanho para a idade, quando confrontados com outros de mesma desova. Devido a isto, não é possível afirmar se os linguados apresentavam algum fator que pudesse interferir no processo de infecção das larvas de nematóides.

Assim, não é possível concluir com os dados disponíveis se esta espécie de linguado pode ser considerada hospedeiro intermediário obrigatório no ciclo de vida de

Contracaecum pelagicum, e/ou se há exigência de um primeiro hospedeiro intermediário, como *A. tonsa*. Por isso, são sugeridos trabalhos de infecção experimental direta e indireta de *Contracaecum* sp. oriundos de aves marinhas, utilizando linguados menores.

Algumas opções de ciclos de vida para anisaquídeos são apresentadas com variação no número de hospedeiros intermediários e paratênicos (Huizinga 1966; Køie 1993; González 1998; Køie 2001). Køie (1993) propôs um ciclo de vida para anisaquídeos, em que as duas primeiras mudas ocorrem no interior do ovo. A larva L3 no ovo é infectante para um hospedeiro intermediário (invertebrado ou peixe) e pode ser transferida de um hospedeiro intermediário-transporte para outro. A terceira muda deve ocorrer num hospedeiro intermediário (peixe ou invertebrado, que não seja crustáceo) (Smith 1984), mas as duas últimas mudas da larva ocorrem no trato digestivo do hospedeiro definitivo antes de se tornar adulta (Køie 1993). Huizinga (1966) também propõe um ciclo de vida para *Contracaecum* spp. que utiliza aves marinhas como hospedeiro definitivo. Este ciclo não difere do proposto por Køie (1993) a não ser no número de mudas que ocorrem dentro do ovo.

Os anisaquídeos têm ampla distribuição geográfica e são facilmente encontrados em diversas espécies de peixes, como linguado *P. adspersus* (Oliva *et al.* 1996) e Solhadas-pedras *P. flesus* (Køie 1999; Schmidt *et al.* 2003), Merluza *Macruronus magellanicus* (Riffo & George-Nascimento 1992), Biqueirão-argentino *Engraulis anchoita* (Timi 2003), Pescada-do-Chile *Merluccius gayi* (Carvajal & Cattán 1985), Pescada-Argentina *M. hibbsi* (Sardella & Timi 1996), Majorra mexicano *Cichlasoma urophthalmus* (Bergmann & Motta 2004), Traíra *Hoplias malabaricus* e Jejú *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Martins *et al.* 2005); e em espécies em cativeiro como a Truta-arco-íris *Oncorhynchus mykiss* e Salmão-prateado *O. kisutch* (González 1998). Também já foram registradas larvas de anisaquídeos em camarão *Heterocarpus reedi* (George-Nascimento & Carvajal 1980) e lulas (Pascual *et al.* 1995; Pascual *et al.* 1996).

É conhecido que peixes e cefalópodes participam da dieta de diversas espécies de aves marinhas como Procellariiformes, Pelecaniformes e Charadriiformes (Ainley *et al.* 1981; Crawford & Dyer 1995; Yorio & Caille 1999; Coelho *et al.* 2004), e que estas são

hospedeiras de alguns anisquídeos (Huizinga 1966, Humphrey *et al.* 1978; George-Nascimento & Carvajal 1980; Santos 1984, Silva *et al.* 2005). Assim, a presença de aves como gaivotas (*Larus dominicanus*), biguá (*Phalacrocorax brasilianus*) e trinta-réis (*Sterna eurygnatha*) em áreas de cultivo (Branco *et al.* 2001), pousados, se alimentando ou sobrevoando, evidencia o potencial de transmissão de parasitos nestas áreas. Pois, quando as aves aquáticas estão próximas, podem defecar sobre o cultivo, liberando ovos de nematóides para a área de criação. De acordo com González (1998) a presença de parasitos nos peixes em cativeiro implica em riscos, principalmente dificuldade na comercialização. Além do comércio, há o risco imediato para a saúde da população no caso de consumo de peixes cru ou mal cozidos, infectados por larvas de anisquídeos (Torres *et al.* 2000).

De acordo com Carvajal e Cattán (1985), os procedimentos de manejo para a remoção de parasitos dos peixes cultivados, aumentam o custo do produto final. Com os procedimentos metodológicos desenvolvidos, e resultados obtidos neste trabalho, foram obtidas ferramentas para desenvolver estratégias de manejo preventivo. Uma estratégia possível seria um monitoramento da água captada para os viveiros. Para isto é necessário verificar quais as espécies de organismos zooplânctônicos estão abundantes no ambiente, se atuam como provável hospedeiro e se há uma elevada prevalência de larvas de nematóides nesses organismos. Desta forma, pode ser estimado o risco de contaminação para os organismos em cativeiro. Caso o risco seja elevado, podem ser tentadas formas de barrar a entrada do zooplâncton por um determinado período. Outra estratégia seria espantar as aves aquáticas das proximidades dos viveiros. Por fim, a aquisição destes conhecimentos e aplicabilidade contribuem para a valorização no produto final da aquicultura e os evidentes benefícios para a saúde pública.

Referências Bibliográficas

AMATO JFR, WA BOEGER & SB AMATO. 1991. Protocolos para laboratório - Coleta e processamento de parasitos de pescado. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 81p.

- AINLEY DG, DW ANDERSON & PR KELLY. 1981. Feeding ecology of marine cormorants in Southwestern North America. *Condor*, 83: 120-131.
- BALBUENA JA, E KARLSBAKK, M SAKSVIK, AM KVENSETH & A NYLUND. 1998. New data on the early development of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda, Anisakidae). *J. Parasitol.*, 84: 615-617.
- BALBUENA JA, E KARLSBAKK, AM KVENSETH, M SAKSVIK & A NYLUND. 2000. Growth and emigration of third-stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in larval herring *Clupea harengus*. *J. Parasitol.*, 86: 1271-1275.
- BERGMANN GT & PJ MOTTA. 2004. Infection by anisakid nematodes *Contracaecum* spp. in the Mayan Cichlid fish "*Cichlasoma (Nandopsis)*" *urophthalmus* (Günther 1862). *J. Parasitol.*, 90: 405-407.
- BERSANO JGF. 2003. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Acartia tonsa*: a potential source of live food for aquaculture. In: Annual Meeting of the World Aquaculture Society, 1., Salvador. 2003. Salvador, BA. p. 95.
- BRANCO JO, JRR BRAUN & JR VERANI. 2001. Seasonal variation in the abundance of seabirds in areas of mariculture. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 44: 395-399.
- BRATTEY J. 1990. Effect of temperature on egg hatching in three ascaridoid nematode species from seals. *Can. B. Fish. Aquat. Sci.*, 222: 27-39.
- BRATTEY J & KJ CLARK. 1992. Effect of temperature on egg hatching and survival of larvae of *Anisakis simplex* B (Nematoda: Ascaridoidea). *Can. J. Zool.*, 70: 274-279.
- BUSH AO, KD LAFFERTY, JM LOTZ & AW SHOSTAK. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.*, 83: 575-583.
- CARVAJAL J & PE CATTAN. 1985. A study of the Anisakid infection in the Chilean hake, *Merluccius gayi* (Guichenot, 1848). *Fish. Res.*, 3: 245-250.
- CARVAJAL J & L GONZÁLEZ. 1990. Presencia de *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) en salmón Coho de Chiloé cultivado en jaulas. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 63: 165-168.

- COELHO EP, VS ALVES, ABA SOARES, GS COUTO, MA EFE, ABB RIBEIRO, J VIELLIARD & LP GONZAGA. 2004. O Atobá-marrom (*Sula leucogaster*) na ilha de Cabo Frio, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. Aves marinhas e insulares brasileiras: bioecologia e conservação. Branco, JO. Itajaí, Universidade do Vale do Itajaí: 233-254.
- CRAWFORD RJM & BM DYER. 1995. Responses by four seabird species to a fluctuating availability of Cape anchovy *Engraulis capensis* of South Africa. *Ibis* 137: 329-339.
- DAVEY JT. 1969. The early development of *Contracaecum osculatum*. *J. Heminthol.*, XLIII: 293-298.
- DEARDORFF TL & RM OVERSTREET. 1982. *Hysterothylacium pelagicum* sp. n. and *H. cornutum* (Stossich, 1904) (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes. *P. Helm. Soc. Wash.*, 49: 246-251.
- EIRAS JC. 1994. Elementos da Ictioparasitologia. Ed. Fundação Antonio de Almeida, Porto, Portugal. 339 p.
- GEORGE-NASCIMENTO M & J CARVAJAL. 1980. Nuevos registros de nematodos anisakidos en la fauna marina chilena. *B. Chil. Parasitol.*, 35: 15-18.
- GONZÁLEZ L. 1998. The life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in Chilean marine farms. *Aquaculture*, 162: 173-186.
- GONZÁLEZ L & J CARVAJAL. 1995. New host records of larval *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in fauna associated with salmonid sea farms in Chile. *Res. Rev. Parasitol.*, 55: 247-253.
- GONZÁLEZ RA & MA KROECK. 2000. Enteric helminths of the shortfin squid *Illex argentinus* in San Matías Gulf (Argentina) as stock discriminants. *Acta Parasitol.*, 45: 89-93.
- HØJGAARD DP. 1998. Impact of temperature, salinity and light on hatching of eggs of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae), isolated by a new method, and some remarks on survival of larvae. *Sarsia*, 83: 21-28.
- HUIZINGA HW. 1966. Studies on the life cycle and development of *Contracaecum spiculigerum* (Rudolphi, 1809) (Ascaroidea: Heterocheilidae) from marine piscivorous birds. *J. Elisha. Mitch. Soc.*, 82: 181-195.

- HUMPHREY SR, CH COURTNEY & DJ FORRESTER. 1978. Community ecology of the helminth parasites of the Brown pelican. *Wilson Bull.*, 90: 587-598.
- IGLESIAS L, A VALERO & FJ ADROHER. 1997. Some factors which influence the *in vitro* maintenance of *Anisakis simplex* (Nematoda). *Folia Parasitol.*, 44: 297-301.
- JACKSON CJ, DJ MARCOGLIESE & MDB BURT. 1997. Role of hyperbenthic crustaceans in the transmission of marine helminth parasites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54: 815-820.
- JOHNSTON TH & PM MAWSON. 1941. Ascaroid nematodes from Australian birds. *Trans. R. Soc. S. Austral.*, 65: 110-115.
- JOHNSTON, TH & PM MAWSON. 1942. Some new and know Australian parasitic nematodes. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, 67: 90-94.
- KIJEWSKA A, J ROKICKI, J SITKO & G WEGRZYN. 2002. Ascaridoidea: a simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. *Exp. Parasitol.*, 101: 35-39.
- KØIE M. 1993. Aspects of the life cycle and morfology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Zool.*, 71: 1289-1296.
- KØIE M. 1999. Metazoan parasites of Flounder *Platichthys flesus* (L.) along a transect from the southwestern to the northeastern Baltic Sea. *ICES J. Mar. Sci.*, 56: 157-163.
- KØIE M. 2001. Experimental infections of copepods and sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* with small ensheathed and large third-stage larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Parasitol. Res.*, 87: 32-36.
- KØIE M, B BERLAND & MDB BURT. 1995. Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 134-139.
- KØIE M & HP FAGERHOLM. 1993. Third-stage larvae emerge from eggs of *Contracaecum osculatatum* (Nematoda, Anisakidae). *J. Parasitol.*, 79: 777-780.

- KØIE M & HP FAGERHOLM. 1995. The life cycle of *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802) sensu stricto (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in view of experimental infections. *Parasitol. Res.*, 81: 481-489.
- MARTINS ML, EM ONAKA & J FENERICK-JR. 2005. Larval *Contracaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Osteichthyes: Erythrinidae) of economic importance in occidental marshlands of Maranhão, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 127: 51-59.
- MCCARTHY J & TA MOORE. 2000. Emerging helminth zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, 30: 1351-1360.
- MORAVEC F, K NAGASAWA & S URAWA. 1985. Some fish nematodes from fresh waters in Hokkaido, Japan. *Folia Parasitol.*, 32: 305-316.
- NAGASAWA K & F MORAVEC. 1995. Larval anisakid nematodes of japanese common squid (*Todarodes pacificus*) from sea of Japan. *J. Parasitol.*, 81: 69-75.
- OLIVA ME, RE CASTRO & R BURGOS. 1996. Parasites of the Flatfish *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) (Pleuronectiformes) from Northern Chile. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91: 301-306.
- OVERSTREET RM. 1978. Marine Maladies? Worms, germs, and other symbionts from the Northern Gulf of Mexico. Mississippi- Alabama Sea Grand Consortium and R. M. Overstreet. Ed. Mississippi, USA. 140 p.
- PASCUAL S, A GONZÁLEZ, C ARIAS & A GUERRA. 1995. Helminth infection in the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda, Ommastrephidae) off NW Spain. *Dis. Aquat. Org.*, 23: 71-75.
- PASCUAL S, C GESTAL, JM ESTÉVEZ, H RODRÍGUEZ, M SOTO, E ABOLLO & C ARIAS. 1996. Parasites in commercially-exploited cephalopods (Mollusca, Cephalopoda) in Spain: an updated perspective. *Aquaculture*, 142: 1-10.
- RIFFO RL & MF GEORGE-NASCIMENTO. 1992. Variaciones de la abundancia de larvas de *Anisakis* sp. e *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) en la Merluza de cola, *Macruronus magellanicus* Lonnberg 1862: la importancia del sexo, tamaño corporal y dieta de hospedador. *Estud. Oceanol.*, 11: 79-84.

- ROHDE K. 1982. Ecology of marine parasites. University of Queensland Press. Queensland. 244p.
- ROZSA L, J REICZIGEL, G MAJOROS. 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. *J. Parasitol.*, 86: 228-232.
- SANTOS CP. 1984. Um nematódeo parasito do pingüim *Spheniscus magellanicus* (Forster) (Ascaridoidea, Anisakidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 233-237.
- SARDELLA NH & JT TIMI. 1996. Parasite communities of *Merluccius hubbsi* from the Argentinian-Uruguayan common fishing zone. *Fish. Res.*, 27: 81-88.
- SCHMIDT V, S ZANDER, W KÖRTING & D STEINHAGEN. 2003. Parasites of the flounder *Platichthys flesus* (L.) from the German Bight, North Sea, and their potential use in ecosystem monitoring. *Helgol. Mar. Res.*, 57: 236-251.
- SILVA RJ, TF RASO, PJ FARIA & FP CAMPOS. 2005. Occurrence of *Contracaecum pelagicum* Johnston & Mawson 1942 (Nematoda, Anisakidae) in *Sula leucogaster* Boddaert 1783 (Pelecaniformes, Sulidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zool.*, 57: 565-567.
- SMITH JW. 1983. *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea): morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. *J. Heminthol.*, 57: 205-224.
- SMITH JD. 1984. Development of *Raphidascaris acus* (Nematoda, Anisakidae) in paratenic, intermediate, and definitive hosts. *Can. J. Zool.*, 62: 1378-1386.
- SMITH JW, AE ELARIFI & R WOOTTEN. 1990. Experimental infection of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802) and *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea). *C. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 2293-2296.
- THOMPSON RCA. 2001. The future impact of societal and cultural factors on parasitic disease – some emerging issues. *Int. J. Parasitol.*, 31: 949-959
- TIMI JT. 2003. Parasites of Argentine anchovy in the south-west Atlantic: latitudinal patterns and their use for discriminations of host populations. *J. Fish Biol.*, 63: 90-107.
- TORRES P, R MOYA & J LAMILLA. 2000. Nematodos anisákidos de interés en salud pública en peces comercializados en Valdivia, Chile. *Arch. Med. Vet.*, 32: 107-113.

- UBEIRA FM, B VALIÑAS, S LORENZO, R IGLESIAS, A FIGUEIRAS & R GARCÍA-VILLAESCUSA. 2000. Anisakidosis y Alergia. Un estudio seroepidemiológico en la Comunidad Autónoma Gallega. *Documentos Técnicos de la Salud Pública*, Série B, nº 24. Ed. Consellería de Sanidade e Servizos Sociais (Xunta de Galicia, España) 102p.
- YORIO P & G CAILLE. 1999. Seabird interactions with coastal fisheries in Northern Patagonia: Use of discards and incidental captures in nets. *Waterbirds*, 22: 207-216.

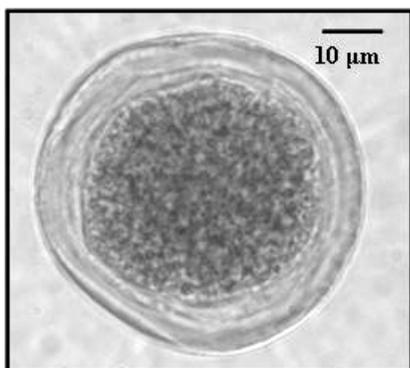


Figura 01 - Ovo de *Contracaecum pelagicum* com duas membranas; externa com rugosidade e uma mais interna.

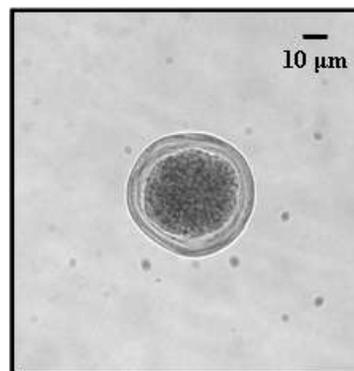


Figura 02 - Ovo de *Contracaecum pelagicum* com embrião em estágio inicial de desenvolvimento não definido.

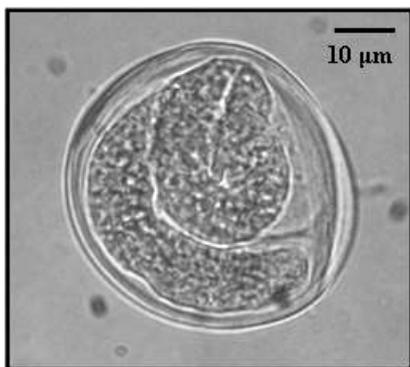


Figura 03 - Ovo de *Contracaecum pelagicum* após 24 h de incubação a 22,7°C, com larva diferenciada.

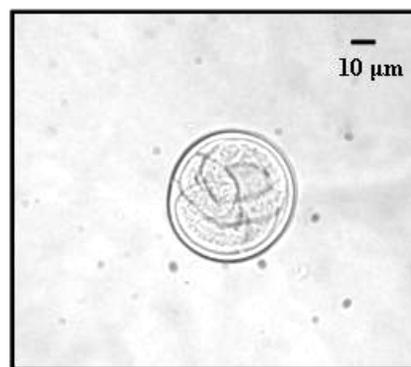


Figura 04 - Ovo de *Contracaecum pelagicum* após 48 h de incubação a 22,7°C, com larva diferenciada.

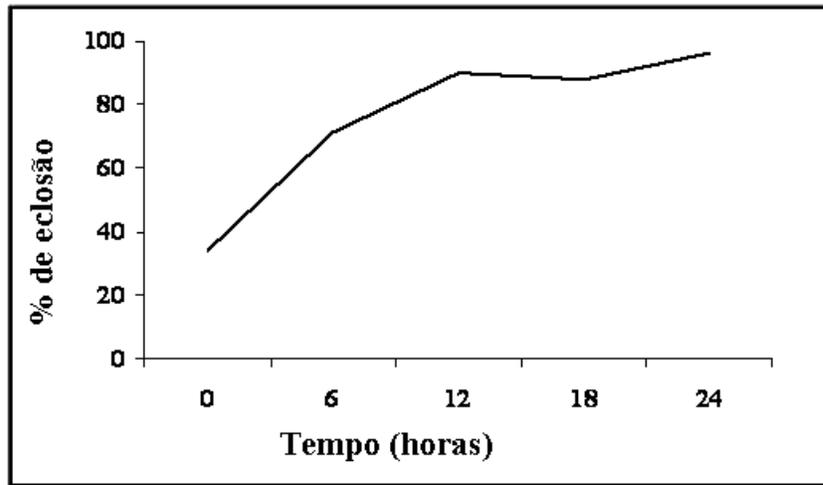


Figura 05 - Porcentagem de eclosão dos ovos de *Contracaecum pelagicum*, incubados a 22,7°C, no período de 24 h após o início da eclosão.

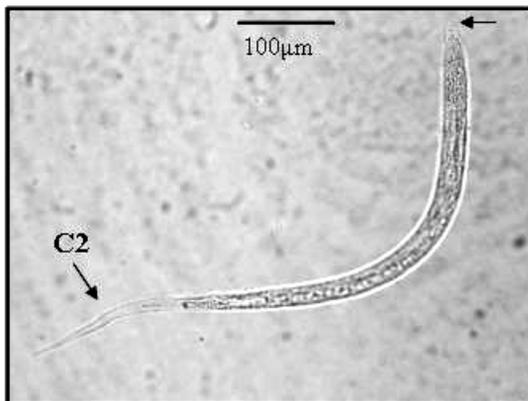


Figura 06 - Larva de *Contracaecum pelagicum* no estágio L3, com dupla cutícula, no momento da eclosão (60 h de incubação).

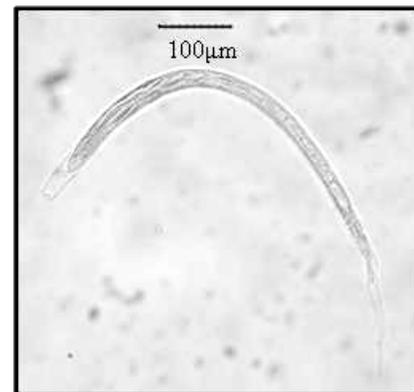


Figura 07 - Larva de *Contracaecum pelagicum* no estágio L3, 60 h depois da eclosão (120 h de incubação).

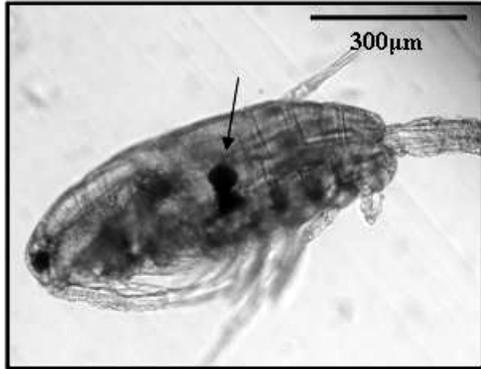


Figura 08 - Copépole *Acartia tonsa* infectado por ovos de *Contracaecum spiculigerum*.



Figura 09 - Copépole *Acartia tonsa* infectado por larva no estágio L3 de *Contracaecum spiculigerum*.

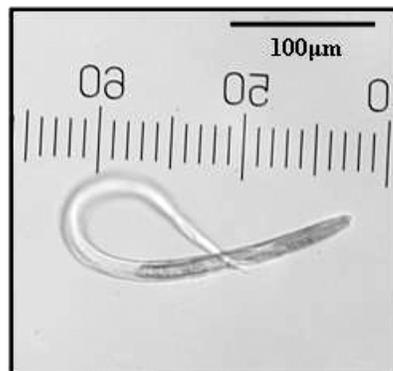


Figura 10 - Larva de *Contracaecum spiculigerum* em L3 retirada do copépole *Acartia tonsa* sem cutícula externa (“capa”).

Tabela 1 - Índices parasitológicos (calculados *sensu* Bush *et al.* 1997), de ovos e larvas de *Contracaecum spiculigerum* em copépodes *Acartia tonsa*, durante sete dias de experimento. N = número total de copépodes analisados por dia.

Dias pós-infecção	Prevalência (%)	Intensidade média de infecção	Abundância média
Dia 1 (n=97)	14,40	1,00	0,14
Dia 2 (n=110)	14,55	1,13	0,16
Dia 3 (n=109)	14,68	1,31	0,19
Dia 4 (n=104)	12,50	1,31	0,16
Dia 5 (n=104)	21,18	1,18	0,25
Dia 6 (n=108)	20,40	1,27	0,26
Dia 7 (n=103)	7,80	1,13	0,09