

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**Nematoides do gênero *Contracaecum* (Nematoda:
Anisakidae) parasitos de *Nannopterum brasiliensis*
(Suliformes: Phalacrocoracidae) e *Hoplias argentinensis*
(Characiformes: Erythrinidae) na Argentina**

Carla Juliete dos Reis Sardella

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**NEMATOIDES DO GÊNERO *Contracaecum* (NEMATODA: ANISAKIDAE)
PARASITOS DE *Nannopterum brasiliense* (SULIFORMES:
PHALACROCORACIDAE) E *Hoplias argentinensis* (CHARACIFORMES:
ERYTHRINIDAE) NA ARGENTINA**

Carla Juliete dos Reis Sardella

Sob a Orientação do Professor
José Luis Fernando Luque Alejos

e Coorientação de
Miguel Mancini

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutora em Ciências**,
no Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ
Abril de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S244n Sardella, Carla Juliete dos Reis, 1992-
 Nematoides do gênero Contracaecum (Nematoda:
Anisakidae) parasitos de Nannopterum brasiliense
(Suliformes: Phalacrocoracidae) e Hoplias
argentinensis (Characiformes: Erythrinidae) na
Argentina / Carla Juliete dos Reis Sardella. - Volta
Redonda, 2022.
 58 f.: il.

 Orientador: José Luis Fernando Luque Alejos.
 Coorientador: Miguel Mancini.
 Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias, 2022.

 1. Parasitos de peixes e aves. I. Luque Alejos,
José Luis Fernando, 1962-, orient. II. Mancini,
Miguel, -, coorient. III Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias. IV. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**



ATA N° 1018/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.013417/2023-60

Seropédica-RJ, 09 de março de 2023.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

CARLA JULIETE DOS REIS SARDELLA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 08/04/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação

(Assinado digitalmente em 10/03/2023 16:10)

JOSE LUIS FERNANDO LUQUE ALEJOS

PRO-REITOR(A) - TITULAR

PROPPG (12.28.01.18)

Matrícula: ###427#6

(Assinado digitalmente em 10/03/2023 09:00)

RAQUEL DE OLIVEIRA SIMOES

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matrícula: ###925#4

(Assinado digitalmente em 09/03/2023 19:30)

ANDERSON DIAS CEZAR

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.877-##

(Assinado digitalmente em 09/03/2023 15:14)

JULIANA MOREIRA DE OLIVEIRA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.777-##

(Assinado digitalmente em 09/03/2023 13:49)

FABIANO PASCHOAL DE OLIVEIRA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.167-##

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que iluminou o meu caminho e me deu forças durante toda esta caminhada. Aos meus pais, Antônio Jorge e Elisanete Aparecida, que mesmo sem terem tido oportunidade de estudar, sempre estiveram ao meu lado fazendo de tudo para que eu pudesse conquistar mais um título, ao meu irmão, Carlos Douglas, meu noivo, Luan Rastoldo, que, com muito carinho, apoio e incentivo não mediram esforços para que eu concluísse mais esta etapa de minha vida. A minha filha, Luna, que mesmo na barriga me incentiva a buscar sempre o melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades encontradas durante minha trajetória.

Aos meus pais Antônio Jorge e Elisanete Aparecida, pois devo a vida e todas as oportunidades que nela tive e que espero um dia poder lhes retribuir, ao meu irmão Carlos Douglas, meu noivo Luan Rastoldo e minha filha Luna, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luis Fernando Luque Alejos, por aceitar me guiar nessa trajetória e também pela oportunidade, ensinamentos e confiança, desde o mestrado, que tornaram esse projeto possível.

Aos colegas, ex colegas e agregados do Laboratório de Parasitologia de Peixes da UFRRJ, Naraiana Taborda, Camila Pantoja, Juliana Moreira, Letícia Gabriela, Bruno Telles, Mariana Nogueira, Aline Carvalho, Jonathas Sousa, Jefferson Chaves e Jose Luis Bautista, que além de amigos representaram minha segunda família, sempre me ajudando em tudo que era preciso sem medir esforços, e nem a distância imposta pelos tempos atuais, fez com que nos afastássemos.

A professora Dra. Raquel Simões da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por todo apoio a minha pesquisa e por sua dedicação no processamento do material e desenvolvimento da minha tese.

Ao Dr. Douglas McIntosh, do Instituto de Parasitologia Animal - UFRRJ, que me deu todo o suporte para a concretização do estudo molecular.

Ao Dr. Miguel Mancini por ter me recebido e permitido a minha instância em seu laboratório na Argentina, além de todo apoio durante as inúmeras coletas que foram fundamentais para a realização deste projeto.

A todos os professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, por todos os ensinamentos passados.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo financiamento através do Programa de Cooperação Internacional Centros Associados da Pós-Graduação Brasil-Argentina (CAPG-BA)

A Universidad Nacional de Río Cuarto, por ter me recebido tão bem e ter me dado tantas oportunidades de aprendizado, por terem cedido espaço e tudo que era necessário para que eu pudesse realizar meu trabalho e aumentar meu conhecimento.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

RESUMO

SARDELLA, CARLA JULIETE DOS REIS. **Nematoides do gênero *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) parasitos de *Nannopterum brasilianus* (Suliformes: Phalacrocoracidae) e *Hoplias argentinensis* (Characiformes: Erythrinidae) na Argentina**, 2022. 57p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

Contracaecum Raillet & Henry, 1912 é um gênero de nematoides parasitas da família Anisakidae Skrjabin & Karokhin, 1945. Estes nematoides são parasitos de animais que se alimentam de peixes, isto é, mamíferos e aves, de onde adquirem as larvas de terceiro estágio que se transformam em adultos sexualmente maduros. Os ovos e os estágios sucessivos de suas larvas usam invertebrados e algumas classes de peixes como hospedeiros intermediários. Este é o único gênero da família Anisakidae que pode infectar animais terrestres, marinhos e de água doce. Os indivíduos do gênero *Contracaecum* se caracterizam por apresentarem esôfago provido de ventrículo, presença de apêndice ventricular posterior, ceco anterior, poro excretor situado na altura dos lábios e adultos apresentando interlábio. O presente trabalho visa contribuir com conhecimentos sobre a biodiversidade de nematoides parasitos de peixes e aves do gênero *Contracaecum* em águas Argentinas, acrescentando novos dados moleculares e morfológicos. Para a primeira espécie apresentada objetivou-se descrever uma nova espécie de *Contracaecum* utilizando adultos e larvas de quarto estágio (L4) coletadas em *Nannopterum brasilianus* (Gmelin, 1789) (syn. *Phalacrocorax brasilianus*) (Suliformes: Phalacrocoracidae) e larvas de terceiro estágio (L3) encontradas no peixe de água doce *Hoplias argentinensis* Rosso, Mabragaña, González- Castro, Bogan, Cardoso, Mabragaña, Delpiani & Díaz de Astarloa, 2018, ambos da província de Córdoba, Argentina, utilizando abordagens morfológicas como microscopia de luz e eletrônica de varredura (MEV) e moleculares baseado no sequenciamento do gene mitocondrial do citocromo c oxidase subunidade II (cox-2), o que permitiu relacionar as larvas encontradas no peixe com os adultos encontrados nas aves. Já para segunda espécie encontrada, o objetivo foi descrever uma espécie nova baseada em características morfológicas do quarto estágio larval e adultos de uma nova espécie também do gênero *Contracaecum*, encontrada parasitando a ave *N. brasilianus* em uma lagoa Argentina. Também foi possível relacionar as larvas e adultos encontrados na ave baseado na morfometria. Até o momento existe o registro de 5 espécies de parasitos do gênero encontrados em *N. brasilianus* no continente americano, totalizando 7 com a inclusão dessas novas duas espécies, *Contracaecum jorgei* e *Contracaecum* n. sp. mostrando a importância de estudos relacionados com o ciclo de vida destes parasitos, principalmente daqueles em que as larvas são encontradas em peixes destinados ao consumo humano, pois a alta densidade de peixes registrados em lagos pampeanos na Argentina pode aumentar o fornecimento de alimentos para as aves, melhorando a chance de infectar o hospedeiro definitivo, permitindo que o ciclo permaneça e acabe infectando também humanos que consomem peixe cru contendo a L3 de *Contracaecum*.

Palavras chave: *Contracaecum*, larvas, adultos, Cox2, microscopia eletrônica de varredura;

ABSTRACT

SARDELLA, CARLA JULIETE DOS REIS. **Nematodes of the genus *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) parasites of *Nannopterum brasiliense* (Suliformes: Phalacrocoracidae) and *Hoplias argentinensis* (Characiformes: Erythrinidae) in Argentina**, 2022. 57p. Thesis (Ph.D. in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Contracaecum Railliet & Henry, 1912 is a genus of parasitic nematodes of the Anisakidae family Skrjabin & Karokhin, 1945. These nematodes are parasites of fish-eating animals, i.e., mammals and birds, from where they acquire third-stage larvae that develop into sexually mature adults. The eggs and successive stages of their larvae use invertebrates and some classes of fish as intermediate hosts. This is the only genus of the Anisakidae family that can infect terrestrial, marine and freshwater animals. Individuals of the *Contracaecum* genus are characterized by presenting an esophagus with a ventricle, presence of posterior ventricular appendix, anterior cecum, excretory pore located at the level of the lips and adults presenting interlabia. The present work aims to contribute with knowledge about the biodiversity of fish and bird parasitic nematodes of the *Contracaecum* genus in Argentine waters, adding new molecular and morphological data. For the first species presented, the objective was to describe a new species of *Contracaecum* using adults and fourth-stage larvae (L4) collected from *Nannopterum brasiliense* (Gmelin, 1789) (syn. *Phalacrocorax brasiliense*) (Suliformes: Phalacrocoracidae) and third-stage larvae (L3) found in freshwater fish *Hoplias argentinensis* Rosso, Mabragaña, González-Castro, Bogan, Cardoso, Mabragaña, Delpiani & Díaz de Astarloa, 2018, both from the province of Córdoba, Argentina, using morphological approaches such as light and scanning electron microscopy (SEM) and molecular based on the sequencing of the mitochondrial gene of cytochrome c oxidase subunit II (cox-2), which allowed us to relate the larvae found in fish with the adults found in birds. For the second species found, the objective was to describe a new species based on morphological characteristics of the fourth larval stage and adults of a new species also from the genus *Contracaecum*, found parasitizing the bird *N. brasiliense* in an Argentine lake. It was also possible to relate the larvae and adults found in the bird based on morphometry. So far there is a record of 5 species of parasites of the genus found in *N. brasiliense* in the American continent, totaling 7 with the inclusion of these two new species, *Contracaecum jorgei* and *Contracaecum* n. sp. showing the importance of studies related to the life cycle of these parasites, especially those in which the larvae are found in fish intended for human consumption, as the high density of fish recorded in Pampa lakes in Argentina can increase the food supply for the birds, improving the chance of infecting the definitive host, allowing the cycle to continue and eventually infecting humans who consume raw fish containing the L3 of *Contracaecum*.

Key words: *Contracaecum*, larvae, adults, Cox2, scanning electron microscopy;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagens da coleta realizada em parceria com Universidad Nacional de Río Cuarto – Argentina (A) Coleta de peixes em um lago urbano. (B) Coleta e preparação da ave coletada. (C) Exemplar do peixe coletado, *H. argentinensis*. (D) Exemplar da ave coletada, *N. brasiliensis* 4
- Figura 2.** Imagens da necropsia da ave, realizada em um laboratório de campo na Argentina (A) Necropsia da ave, *N. brasiliensis*. (B) Proventrículo e moela. (C) Coleta dos parasitos no proventrículo (região anterior). (D) Intestino 5
- Figura 3.** Imagens da necropsia do peixe, realizada no Laboratório de Farmacologia da Universidad Nacional de Río Cuarto (A) Necropsia do peixe *H. argentinensis*. (B) Larvas de terceiro estágio presentes nos órgãos do peixe 5
- Figura 4.** Imagens da coleta dos parasitos adultos, L4 e L3 (A) Coleta dos parasitos no proventrículo de *N. brasiliensis*. (B) Parasitos adultos e L4. (C) Coleta de parasitos encistados de *H. argentinensis*. (D) Parasitos coletados no intestino e estômago de *H. argentinensis* 7
- Figura 5.** Adultos de *Contracaecum jorgei* (A) Extremidade anterior, vista dorsoventral mostrando lábios, colar cefálico, papila cefálica, anel nervoso, esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular. (B) Lábios dorsal e ventrolateral, interlábio e colar cefálico. (C) Macho, extremidade posterior mostrando distribuição da papila pré e pós-cloacal, espículos e cloaca. (D) Fêmea, extremidade posterior mostrando a cloaca e fasmídeo. (E) Fêmea, região mediana do corpo, vulva 12
- Figura 6.** Microscopia eletrônica de varredura de adultos de *Contracaecum jorgei* (A) Macho, extremidade anterior, vista lateral mostrando colar cefálico e deirídeos. (B) Detalhe mostrando os deirídeos. (C) Fêmea, extremidade anterior mostrando lábios dorsal e ventrolateral, interlábio (seta) e fosseta sensorial (*). (D) Lábio ventrolateral da fêmea mostrando uma papila dupla grande (seta), uma papila externa-lateral (*) e anfídeo (a). (E) Fêmea, extremidade posterior mostrando cauda cônica com ponta pontiaguda. (F) Macho, extremidade posterior mostrando papilas pré e pós-cloacais, espículos e cauda cônica com ponta pontiaguda. (G) Extremidade distal do espículo, vista lateral. (H) Macho, vista ventral, extremidade posterior mostrando papilas pré-cloacais, papilas pós-cloacais e papila mediana (seta). (I) Macho, visão ventral mostrando papilas pós-cloacais. Abreviaturas: d, deirídeo; p, fasmídeo; a1, par de papila proximal; a2, par de papila paracloacal; a3 e a4, papilas subventrais distais; a5 e a6, papilas sublaterais distais 13
- Figura 7.** Larvas de *Contracaecum jorgei* (A) L4, extremidade anterior, vista lateral mostrando colar cefálico, papila cefálica, anel nervoso, esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular. (B) L4, extremidade posterior mostrando uma pequena projeção com cutícula estriada transversalmente. (C) L4, lábios dorsal e ventrolateral, colar cefálico e papila cefálica. (D) L3, extremidade anterior, vista lateral mostrando dente larval, cutícula estriada transversalmente, anel nervoso, esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular. (E) L3, extremidade posterior mostrando uma pequena projeção com cutícula estriada transversalmente 14

Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura dos estágios larvais de *Contracaecum jorgei* (A) L4, extremidade anterior, vista lateral mostrando extremidade cefálica arredondada com três lábios bem desenvolvidos (um dorsal e dois ventrolaterais), aurículas (seta) e papilas cefálicas do lábio ventrolateral. (B) L4, extremidade posterior mostrando cauda cônica com ponta pontiaguda. (C) L3, extremidade anterior, vista lateral mostrando a extremidade cefálica arredondada com um lábio com pequeno dente larval (seta). (D) L3, detalhe mostrando o dente larval. (E) L3, extremidade posterior mostrando abertura cloacal. (F) L3, detalhe mostrando cauda cônica com ponta pontiaguda..... 15

Figura 9. Relações filogenéticas dentro do gênero *Contracaecum* com base no fragmento parcial do gene citocromo c oxidase II. A árvore foi inferida usando a máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (IB) com o modelo HKY + I + G. O suporte nodal é descrito à esquerda por réplicas de bootstrap e à direita pela probabilidade posterior de cada nó representado. * Baixo suporte nodal em ML ou BI; ** incongruência entre ML e BI. A barra de escala representa o número de substituições por site..... 17

Figura 10. Adultos de *Contracaecum* n. sp. (A) Extremidade anterior, vista lateral mostrando lábios, colar cefálico, papila cefálica, anel nervoso, esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular. (B) Macho, extremidade posterior mostrando distribuição das papilas pré e pós-cloacais, espículos e cloaca. (C) Lábios dorsal e ventrolateral, interlábios e colar cefálico, projetando-se lateralmente, lembrando espinhos. (D) Fêmea, extremidade posterior mostrando cloaca. (E) Fêmea, região mediana do corpo, vulva. (F) Macho, extremidade posterior, vista ventral mostrando a distribuição da papila pós-cloacal. Abreviaturas: p, fasmídeo; a1 e a2, papilas sublaterais distais; a3, a4 e a5, papilas subventrais distais; a6, a7 e a8, papilas paracloacais.. 20

Figura 11. Imagens microscópicas de adultos de *Contracaecum* n. sp. (A) Macho, extremidade anterior mostrando os lábios dorsal e ventrolateral, interlábio (*). (B) Macho, extremidade anterior, vista lateral mostrando colar cefálico e anel nervoso. (C) Lábios dorsal e ventrolateral, interlábio e colar cefálico, projetando-se lateralmente, lembrando espinhos (seta). (D) Macho, corpo mostrando esôfago, ventrículo e apêndice ventricular. (E) Fêmea, vulva. (F) Macho, visão ventral mostrando papilas pós-cloacais. (G) Fêmea, cauda. Abreviaturas: nr, anel nervoso; oe, esôfago; ve, ventrículo; ap, apêndice ventricular; v, vulva; c, cloaca; p, fasmídeo; a1 e a2, papilas sublaterais distais; a3, a4 e a5, papilas subventrais distais; a6, a7 e a8, papilas paracloacais; pc, papilas pré-cloacais..... 21

Figura 12. Quarto estágio larval de *Contracaecum* n. sp. (A) Extremidade anterior, vista lateral mostrando colar cefálico, papila cefálica, anel nervoso, esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular. (B) Lábios dorsal e ventrolateral, colar cefálico e papila cefálica. (C) Extremidade posterior mostrando pequena projeção com cutícula estriada transversalmente; Imagens microscópicas do quarto estágio larval de *Contracaecum* n. sp. (D) Lábios dorsal e ventrolateral, formação inicial da projeção lateral do colar cefálico e papila cefálica. (E) Lábios dorsal e ventrolateral. (F) Extremidade posterior 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Contracaecum</i> que parasitam aves e mamíferos marinhos das Américas	29
Tabela 2. Dados morfométricos (em mm) de <i>Contracaecum</i> n. sp. espécimes machos e fêmeas de <i>Nannopterum brasilianus</i> coletados na província de Córdoba, Argentina, em comparação com outros parasitos coletados no mesmo hospedeiro na América do Sul	32
Tabela 3. Dados morfométricos (em mm) de larvas de quarto estágio de <i>Contracaecum</i> n. sp. de <i>Nannopterum brasilianus</i> do presente estudo em comparação com outras larvas descritas	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1 Coleta e processamento	3
2.2 Estudo morfológico	6
2.3 Estudo molecular e extração de DNA	7
2.4 Reações em cadeia de polimerase (PCR) da região codificante da subunidade II da citocromo oxidase (Cox2) do DNA mitocondrial (mtDNA).....	8
2.5 Sequenciamento e análises filogenéticas	8
3. RESULTADOS	9
3.1 Espécie 1: <i>Contracaecum jorgei</i> Sardella, Mancini, Salinas, Simões e Luque, 2020.....	9
3.1.2 Molecular e análises filogenéticas	16
3.2 Espécie 2: <i>Contracaecum</i> n. sp.	18
4. DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÕES GERAIS	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
7. ANEXO: Artigo publicado: A new species of <i>Contracaecum</i> (Nematoda: Anisakidae) found parasitizing <i>Nannopterum brasilianus</i> (Suliformes: Phalacrocoracidae) and <i>Hoplias argentinensis</i> (Characiformes: Erythrinidae) in South America: morphological and molecular characterization of larval and adult stages.....	46

1. INTRODUÇÃO

O parasitismo é um dos modos de vida mais bem-sucedidos exibidos pelos organismos vivos, sendo medido pela frequência com que evolui e quantas espécies de parasitos existem atualmente (HUGOT *et al.*, 2001). A diversidade de espécies de parasitos tem sido estimada por diversos autores, porém é difícil saber com precisão quantas espécies existem, parte-se do princípio de que nem mesmos os hospedeiros vertebrados são conhecidos por completo. Os parasitos representam um dos maiores componentes da biodiversidade (LEFEVRE *et al.*, 2009) no entanto de 10 a 20% de todos os tipos existentes de organismos parasitas são conhecidos pela ciência (HAMMOND, 1992; POULIN & MOURAND 2000; POULIN, 2014).

Contracaecum Railliet & Henry, 1912 é um gênero de nematoides parasitas da família Anisakidae Skrjabin & Karokhin, 1945, sendo esta, a maior família de Ascaridoidea Railliet & Henry, 1915 e inclui nematoides que parasitam peixes, mamíferos marinhos, répteis e aves piscívoras (ANDERSON, 2000; ANDERSON *et al.* 2009).

Nematoides do gênero *Contracaecum* foram registrados em diferentes partes do mundo, parasitando organismos aquáticos em ecossistemas de água doce, salobra e marinhos (BIOLÉ *et al.*, 2012). Várias espécies desse gênero foram relatadas ao redor do mundo em muitas espécies de aves piscívoras, incluindo aquelas pertencentes à família Phalacrocoracidae (ABOLLO *et al.*, 2001). Seu ciclo de vida é heteroxeno, envolvendo aves piscívoras e mamíferos marinhos, incluindo cetáceos e pinípedes (hospedeiros definitivos), pequenos crustáceos (primeiro hospedeiro intermediário) e diversos peixes (hospedeiros intermediários) (KØIE & FAGERHOLM, 1995). As aves são infectadas ao comer peixes que apresentam larvas de terceiro estágio (L3), geralmente encapsuladas nas vísceras e os peixes as adquirem ao ingerir outros peixes e/ou crustáceos contendo larvas de segundo estágio ou L3 (ANDERSON, 2000). Os adultos são encontrados parasitando o intestino e o proventrículo do hospedeiro definitivo, onde costumam causar lesões patológicas (GARBIN *et al.*, 2011; VIOLANTE-GONZÁLEZ *et al.*, 2011).

Muitas espécies de aves que comem peixes como os cormorões (Phalacrocoracidae), foram relatadas como hospedeiros definitivos desses nematoides em todo o mundo (ANDERSON, 2000; MATTIUCCI *et al.*, 2008). *Nannopterum brasiliensis* (Gmelin, 1789) (sin. *Phalacrocorax brasiliensis*) (Suliformes: Phalacrocoracidae) vive em ambientes de água doce e marinhos (KALMBACH & BECKER, 2005) e é amplamente distribuído desde o sul da América do Sul até o extremo norte, Argentina, Chile e Texas, sendo a única da família encontrada em toda a região Neotropical. (MORRISON *et al.*, 1979; HARRISON, 1985; FEDYNICH *et al.*, 1997; AMATO, 2006; GARBIN *et al.*, 2011, KENNEDY & SPENCER, 2014). Esta ave pode ser gravemente afetada por doenças parasitárias, principalmente devido ao hábito de regurgitação alimentar dos pais para seus filhotes e alta carga parasitária que apresentam (KUIKEN *et al.*, 1999; DZIEKONSKA-RYNKO & ROKICKI, 2008).

Cinco espécies de *Contracaecum* foram relatadas parasitando *N. brasiliensis* na América: *Contracaecum rudolphii* Hartwich, 1964 (sin. *C. spiculigerum*) no Brasil, Chile, Cuba e EUA (BARUŠ, 1966; FEDYNICH *et al.*, 1997; TORRES *et al.*, 2000; AMATO *et al.*, 2006); *Contracaecum multipapillatum* Drasche, 1882 no México (VIDAL MARTÍNEZ *et al.*, 1994; VIOLANTE-GONZÁLEZ *et al.*, 2011); *Contracaecum australe* Garbin, Mattiucci, Paoletti, González-Acuña e Nascetti, 2011 no Chile e Argentina (GARBIN *et al.*, 2011; BIOLÉ *et al.*, 2012); *Contracaecum travassosi* Gutierrez, 1943 e *Contracaecum caballeroi* Bravo-Hollis, 1939 no Uruguai (LENT & FREITAS, 1948).

O objetivo do presente estudo foi descrever duas novas espécies de *Contracaecum*, usando para uma delas, microscopia de luz e eletrônica de varredura (MEV) para adultos e larvas de

quarto estágio (L4) encontradas em *N. brasiliensis* e L3 encontradas no peixe de água doce *Hoplias argentinensis* Rosso, Mabragaña, González- Castro, Bogan, Cardoso, Mabragaña, Delpiani & Díaz de Astarloa, 2018. Além disso, dados filogenéticos moleculares foram usados para determinar suas relações dentro do gênero. Para a outra espécie, foram utilizadas técnicas morfológicas para o quarto estágio larval e adultos encontrados, também do gênero *Contracaecum*, parasitando *N. brasiliensis*, na Província de Córdoba, Argentina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, os métodos utilizados para identificação foram microscopia de luz para as espécies *Contracaecum jorgei* e *Contracaecum* n. sp. e microscopia eletrônica de varredura (MEV) complementada com análise de sequência da subunidade II do citocromo c-oxidase mitocondrial (Cox2) para a espécie *C. jorgei*.

2.1 Coleta e processamento

Foram analisadas 3 aves da espécie *N. brasiliensis* e um exemplar do peixe *Hoplias argentinensis* obtidos entre setembro e dezembro de 2017, durante uma coleta em parceria com a Universidad Nacional de Río Cuarto, através do programa binacional financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Fig. 1). As coletas foram realizadas em duas localidades, a primeira em um lago Pampeano raso (33°25'S, 62°54'O) e a segunda em um lago urbano (33°06'S 64°22'O), ambos na Argentina.

Para a espécie *C. jorgei* encontrada, indivíduos adultos e L4 foram coletados do intestino e proventrículo de dois espécimes de *N. brasiliensis* (Fig. 2), e espécimes L3 foram coletados do intestino e estômago de um espécime de *H. argentinensis* (Fig. 3). As aves foram transportadas para um laboratório de campo, onde foram pesadas e necropsiadas. Durante a necropsia, todo o trato digestivo foi removido e analisado. O conteúdo foi lavado com água em peneira com malha de 0,25mm e o sedimento foi colocado em placas de Petri para coleta dos nematoides. O espécime de peixe foi mantido em uma caixa de gelo para garantir o bom estado morfológico dos parasitos e protegê-los durante o transporte ao Laboratório de Farmacologia da Universidad Nacional de Río Cuarto, onde o espécime foi pesado, medido e posteriormente necropsiado, através de uma incisão ventral que vai da abertura anal até a linha do opérculo para expor a cavidade corporal. Todos os órgãos internos foram individualizados e colocados em placas de Petri contendo solução salina (cloreto de sódio 0,65%), e posteriormente examinados com auxílio de microscópio estereoscópico para coleta dos parasitos. Os nematoides isolados foram fixados e armazenados em etanol 70%.

Para a espécie *Contracaecum* n. sp., nematoides do quarto estágio larval (L4) e adultos foram coletados no intestino de um espécime de *N. brasiliensis*, a ave coletada foi transportada em caixa térmica com gelo até o laboratório da Universidad Nacional de Río Cuarto, onde foi pesada e necropsiada. Durante a necropsia, todo o trato digestivo foi removido e analisado. O conteúdo foi lavado com água em peneira com malha de 0,25 mm e o sedimento colocado em placas de Petri e posteriormente examinado com auxílio de microscópio estereoscópico para coleta dos nematoides. Os nematoides isolados foram fixados em formalina 5% por 48 horas e depois conservados em álcool 70% para identificação morfológica.



Figura 1. Imagens da coleta realizada em parceria com Universidad Nacional de Río Curto – Argentina (A) Coleta de peixes em um lago urbano. (B) Coleta e preparação da ave coletada. (C) Exemplar do peixe coletado, *H. argentinensis*. (D) Exemplar da ave coletada, *N. brasiliensis*.

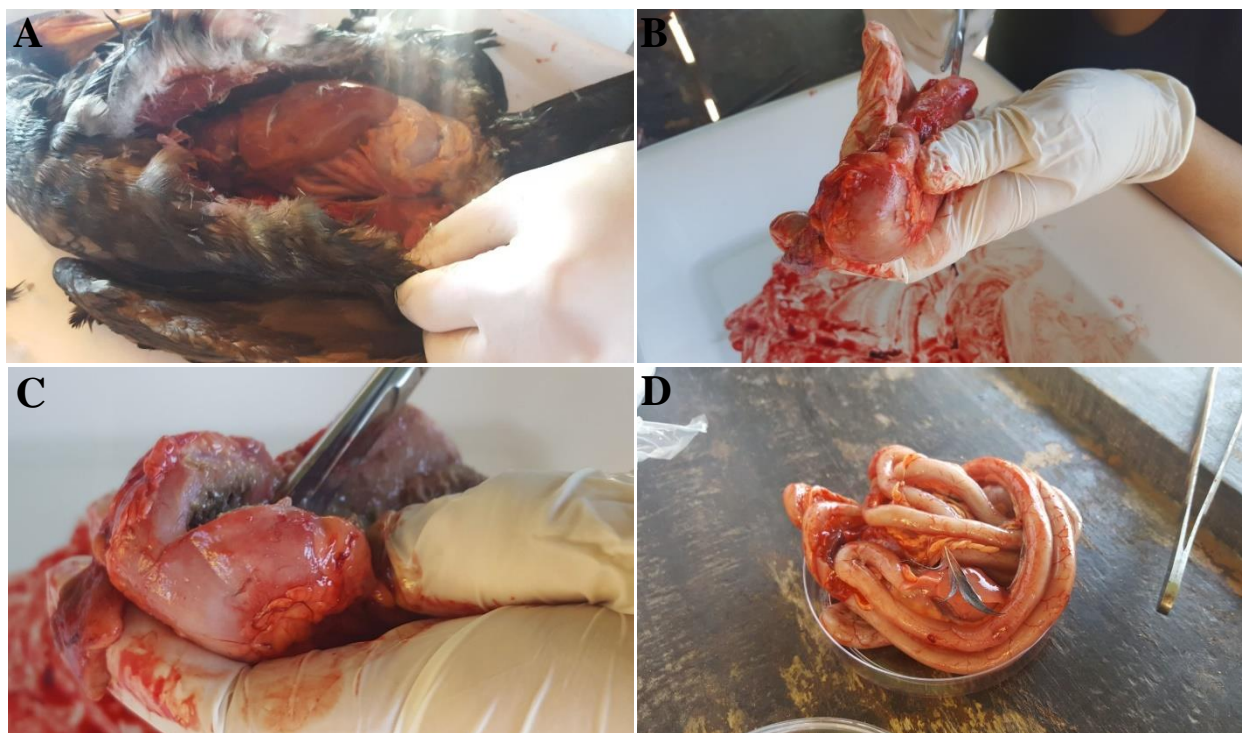


Figura 2. Imagens da necropsia da ave, realizada em um laboratório de campo na Argentina (A) Necropsia da ave, *N. brasiliensis*. (B) Proventrículo e moela. (C) Coleta dos parasitos no proventrículo (região anterior). (D) Intestino.

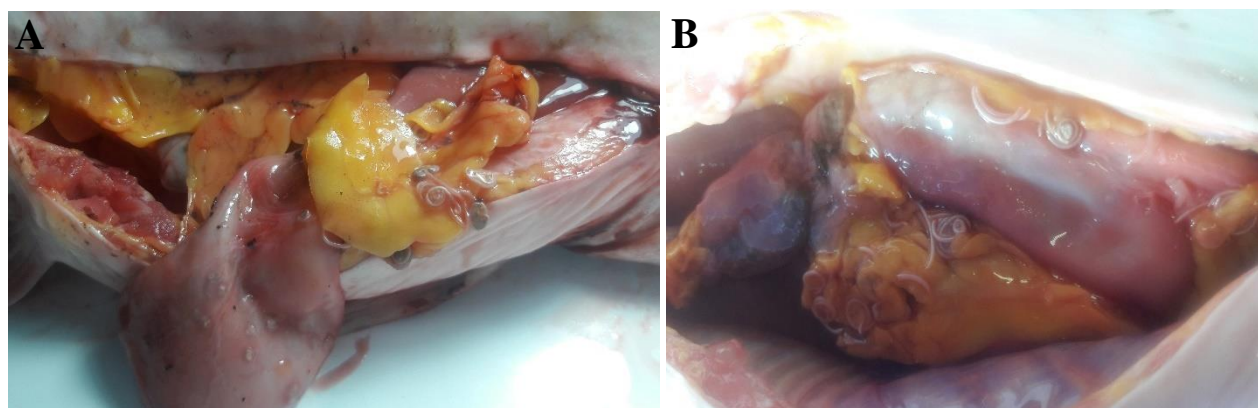


Figura 3. Imagens da necropsia do peixe, realizada no Laboratório de Farmacologia da Universidad Nacional de Río Cuarto (A) Necropsia do peixe *H. argentinensis*. (B) Larvas de terceiro estágio presentes nos órgãos do peixe.

2.2 Estudo morfológico

Tanto os nematoides adultos e L4 de *C. jorgei* e *Contracaecum* n. sp., coletados em *N. brasiliensis* e o L3 coletados de *H. argentinensis* de *C. jorgei* foram examinados morfolologicamente (Fig.4). Posteriormente, as partes anterior e posterior dos espécimes foram clarificadas em glicerina. As medidas foram feitas em milímetros (as médias estão representadas entre parênteses). As análises morfológicas foram conduzidas usando um microscópio óptico Olympus BX51 (Tóquio, Japão). A identificação dos nematoides foi feita de acordo com as chaves de Anderson (2000) e Luque *et al.* (2011). Holótipo, alótipo e parátipos foram depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil (CHIOC). Para a análise de microscopia eletrônica de varredura, utilizada apenas para *C. jorgei*, um adulto macho e fêmea, um L4 e um L3 foram desidratados através de uma série crescente de etanóis (80°GL, 90°GL e 96°GL por 2h em cada concentração, 100°GL durante a noite, 100°GL novamente por 1h), secos em hexametildisilazano por 15 min e deixados em condições ambientais até total evaporação do composto, revestidos em ouro e examinados em um JEOL JSM-740 1 F, a uma tensão de aceleração de 4 kV. As amostras foram montadas em tubos de alumínio, revestidos com uma camada de ouro de 20nm e examinadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6390LV (operando a 15 kV) (JEOL, Akishima, Tóquio, Japão) na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Os indivíduos coletados foram depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

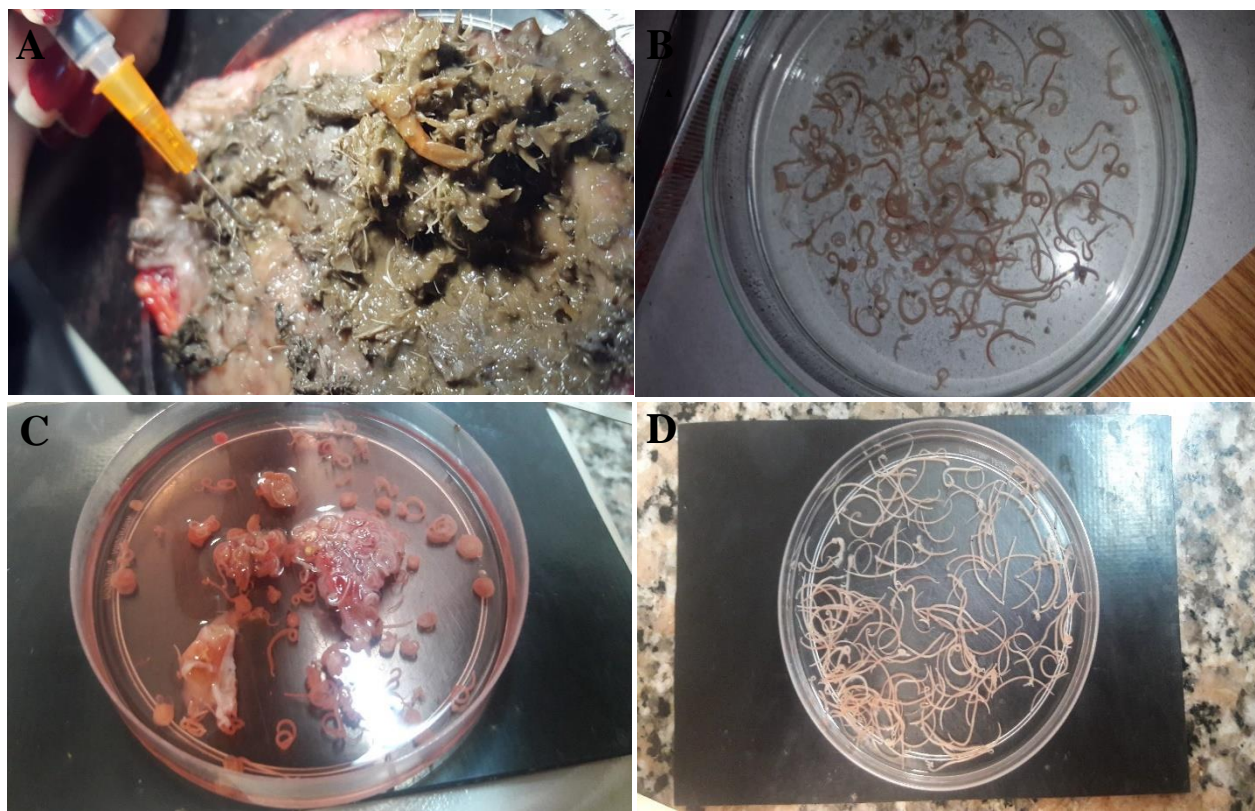


Figura 4. Imagens da coleta dos parasitos adultos, L4 e L3 (A) Coleta dos parasitos no proventriculo de *N. brasiliensis*. (B) Parasitos adultos e L4. (C) Coleta de parasitos encistados de *H. argentinesis*. (D) Parasitos coletados no intestino e estômago de *H. argentinensis*.

2.3 Estudo molecular e extração de DNA

Para a espécie *C. jorgei* também foram realizados estudos moleculares. A parte do meio de dois nematoides adultos, um L4 e um L3, foram separados do resto do corpo e usados para caracterizar geneticamente os espécimes individuais por sequenciamento do gene mitocondrial (mt) do citocromo c oxidase subunidade II (cox-2). O DNA genômico foi isolado usando o protocolo fenol/clorofórmio como em Billings *et al.* (1998). A amostra foi lavada duas vezes com água ultrapura e em seguida foram adicionados 200 microlitros (μ L) de tampão de digestão e incubado por 30 minutos a uma temperatura de 37°C. Em seguida foram adicionados 20 μ L de proteinase K e a amostra foi incubada a 55°C por 2 horas. Foram adicionados 200 μ L de fenol e em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm durante 2 minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado e transferido para um microtubo novo estéril. Foram adicionados 100 μ L de fenol e 100 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico e as amostras foram centrifugadas novamente à 14000rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado e esse passo foi repetido mais uma vez. Foi adicionado 400 μ L de etanol 100% e em seguida a amostra foi centrifugada a 14000rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi lavado com 400 μ L de etanol 70%, logo após foi centrifugado durante 15 minutos. Após esta etapa o etanol foi descartado. O pellet foi deixado para secar durante 5 minutos e o DNA foi ressuscitado em 50 μ L de água ultrapura. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

2.4 Reações em cadeia de polimerase (PCR) da região codificante da subunidade II da citocromo oxidase (Cox2 mtDNA)

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) da região Cox2 mtDNA foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 211 (5' TTTTCTAGTTATATATAGATTGRTTTYAT3') e 210 (5' CACCAACTCTTAAAATTATC 3') desenvolvidos por Nadler e Hudspeth (2000). As reações foram realizadas em um volume de 25 µl com 20 mM de cloridrato de Tris (Tris-HCl) em pH 8,4; 50 mM de cloreto de potássio (KCl); 250 1M de cada desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs); 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,5 1M de cada iniciador oligonucleotídico; 1,25 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA); e 2 µl de DNA genômico.

O PCR foi realizado utilizando os parâmetros de ciclagem mostrados nos trabalhos de Zhu *et al.*, 1998 e Nadler & Hudspeth, 2000.

2.5 Sequenciamento e análises filogenéticas

Os produtos da PCR foram visualizados com coloração Sybergreen (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) antes da eletroforese em géis de agarose a 1,5%. Os produtos amplificados foram purificados com Exo-SAP-IT seguindo as instruções do fabricante, sequenciados através do método de Sanger utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores das reações de PCR e o kit de reação de sequenciamento Cycle Sequencing Cycle de ABI PRISM BigDye em um sequenciador MegaBACE.

Todas as análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Para examinar as relações filogenéticas, as sequências de nucleotídeos obtidas neste estudo e aquelas obtidas do GenBank foram alinhadas com o algoritmo CLUSTAL W do Bioedit Package (Thompson *et al.*, 1994; Hall, 1999). Sequências de *Toxascaris leonina* (NC023504) e *Ascaris lumbricoides* (AF179907) foram usadas como grupos externos. O melhor modelo evolutivo para o gene cox-2 foi inferido pelo critério de inferência Bayesiana (IB) usando o software MEGA 7.0 para ambas as análises (Tamura *et al.*, 2011). O mesmo software foi usado para construção de distâncias genéticas usando dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). O suporte estatístico para a árvore cox-2 foi determinado por uma pesquisa heurística com 1000 réplicas bootstrap (Guindon & Gascuel, 2003) e probabilidade posterior (PP) para IB executado em MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2005). As simulações de Markov Chain Monte Carlo foram rodadas por 89 gerações e amostradas a cada 85 gerações, com um burn-in de 10%, no BEAST versão 1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007). O suporte nodal da topologia de cada gene foi calculado pela replicação bootstrap e o PP de 50%. As análises filogenéticas das árvores ML e BI foram feitas com o mtDNA cox-2 de larvas (L3 e L4) e adultos de *Contracaecum n. sp.* As sequências obtidas foram depositadas no GenBank sob os números de acesso MT304462 (adulto), MT304463 (L4) e MT304464 (L3).

3. RESULTADOS

3.1 *Contracaecum jorgei*

Filo Nematoda

Superfamília Ascaridoidea Railliet & Henry, 1915

Família Aniskidae Skrjabin & Karokhin, 1945

Gênero *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912

Contracaecum jorgei Sardella, Mancini, Salinas, Simões e Luque, 2020

Descrição

Morfologia geral: Corpo robusto, filiforme com finas estrias cuticulares transversais ao longo do corpo, mais evidentes na região anterior e posterior. Interlábio de formato subtriangular, ponta distal não bifurcada e do mesmo comprimento dos lábios com uma incisura apical rasa (figs. 5B e 6C). Lábios com duas aurículas conspícuas e lobadas, cada uma com duas fossas sensoriais proeminentes na extremidade externa (fig. 6C). Lábio dorsal maior que os lábios ventrolaterais com duas papilas duplas sublaterais, cada lábio ventrolateral com uma pequena papila externo-lateral com ornamentação cuticular irregular e abertura separada em forma de poro de anfídeo, além de papila dupla grande (fig. 6C, D). Colar cefálico conspícuo com região lateral em forma de V sem estrias (fig. 6A, C). Esôfago com ventrículo globular reduzido (fig. 5A). Poro excretor na base dos lábios. Deirídeos ligeiramente anteriores ao anel nervoso (figs. 5A e 6A, B), formato arredondado, não visível em todos os espécimes. Ventrículo com apêndice posterior (fig. 5A), ceco intestinal bem desenvolvido, mais longo que o apêndice ventricular com porção final arredondada (fig. 1A). Macho e fêmea apresentando cauda cônica com ponta pontiaguda (figs. 5C, D e 6E, F).

Macho: Baseado em holótipo e oito parátipos. Comprimento do corpo 14,31–20,98mm (15,95mm), largura no nível ceco intestinal 0,29–0,59mm (0,38mm). Distância da extremidade anterior ao anel nervoso 0,29–0,46mm (0,37mm). Distância da extremidade anterior aos deirídeos 0,29mm (n = 1). Comprimento do esôfago 2,01–3,88mm (2,62mm) e largura 0,09–0,19mm (0,12mm). Comprimento do ceco intestinal 1,19–3,32mm (1,94mm) e largura 0,07–0,15mm (0,09mm). Relação entre o comprimento do ceco intestinal e o comprimento do corpo de 8,00–15,83%. Comprimento do ventrículo 0,03–0,09mm (0,05mm) e largura 0,04–0,07mm (0,06mm). Comprimento do apêndice ventricular 0,29–0,57mm (0,40mm) e largura 0,04–0,09mm (0,06mm). Comprimento do apêndice ventricular representando 1,82–3,41% do comprimento do corpo. Comprimento da cauda 0,15–0,21mm (0,17mm). Extremidade caudal apresentando 26 pares de papilas pré-cloacais equidistantes, formando duas linhas subventrais estendendo-se anteriormente (figs. 5C e 6F). Seis pares de papilas pós-cloacais: o primeiro par de papilas proximais subventrais posteriores à cloaca, o segundo par de papilas paracloacais grandes (o par de papilas paracloacais são deslocados assimetricamente para o primeiro par proximal, o primeiro par mais anterior do que o segundo par) e quatro pares de papilas distais (dois pares subventrais e dois pares sublaterais) (fig. 6I). Um par de fasmídeos situados entre os pares sublaterais de papilas. Placa mediana (papila mediana) pouco visível na borda anterior da cloaca (fig. 6H). Espículos subiguais, com ponta distal (figs. 5C e 6G). Comprimento do espículo direito e esquerdo 2,28–3,63mm (2,81mm) (n = 4) e 2,03–3,18mm (2,61mm) (n = 4), representando 13,47–19,72% e 13,17–17,28% do comprimento total do corpo, respectivamente.

Fêmea: Baseado no alótipo e cinco parátipos. Comprimento do corpo 15,25–18,77mm (16,64mm) e largura ao nível do ceco intestinal 0,32–0,50mm (0,40mm). Distância da extremidade anterior ao anel nervoso 0,30–0,39mm (0,36mm). Deirídios não foram visualizados. Comprimento do esôfago 2,50–3,81mm (2,96mm) e largura 0,08–0,12mm (0,10mm). Comprimento do ceco intestinal 1,60–2,10mm (1,90mm) e largura 0,07–0,15mm (0,10mm). Relação entre o comprimento do ceco intestinal e o comprimento do corpo de 10,53–11,18%. Comprimento do ventrículo 0,02–0,07mm (0,04mm) e largura 0,02–0,07mm (0,05mm). Comprimento do apêndice ventricular 0,40–0,61mm (0,49mm) e largura 0,07–0,09mm (0,07mm). Comprimento do apêndice ventricular representando 2,63–3,26% do comprimento do corpo. Vulva na metade anterior do corpo (fig. 5E). Distância da extremidade anterior à vulva 6,57–8,48mm (7,86mm). Proporção de vulva para comprimento corporal 43,11–45,17%. Comprimento da cauda 0,17–0,25mm (0,22mm). Um par de fasmídeos na extremidade posterior (figs 5D e 6E).

L4: Baseado em seis parátipos. Nematóides de grande tamanho, branco ou amarelo-esbranquiçado. Cutícula estriada transversalmente e mais distinta nas extremidades do corpo (fig. 7A-C). Extremidade cefálica arredondada com três lábios bem desenvolvidos (um dorsal e dois ventrolaterais) (figs. 7C e 8A). Lábios com duas aurículas conspícuas e lobadas, ausência de interlábios (fig. 8A). Lábios lisos, sem estrias cuticulares e auriculares, apresentando papilas cefálicas em cada lábio ventrolateral, com papila oval única e anfídeo lateral; collar cefálico bem desenvolvido. Comprimento do corpo 14,01–16,67mm (15,17mm) e largura ao nível do ceco 0,21–0,52mm (0,30mm). Poro excretor localizado entre os lábios ventrolaterais, de difícil visualização. Derídeos não visíveis. Distância da extremidade anterior ao anel nervoso 0,28–0,42mm (0,32mm). Comprimento do esôfago 1,99–2,91mm (2,24mm) e largura 0,08–0,12mm (0,09mm) (fig. 7A). Comprimento do ceco intestinal 1,31–2,26mm (1,56mm) e largura 0,08–0,17mm (0,11mm) (fig. 7A). Relação entre o comprimento do ceco intestinal e o comprimento do corpo de 9,35–13,57%. Comprimento do ventrículo oval 0,05–0,10mm (0,08mm) e largura 0,05–0,13mm (0,10mm) (fig. 7A). Comprimento do apêndice ventricular 0,31–0,50mm (0,42mm) e largura 0,05–0,12mm (0,07mm) (fig. 3A). Comprimento do apêndice ventricular representando 2,27–2,99% do comprimento do corpo. Cauda cônica com ponta pontiaguda com 0,10–0,18mm (0,14mm) de comprimento (figs. 7B e 8B).

L3: Baseado em quatro parátipos. Nematóides de tamanho médio, branco com cutícula estriada transversalmente (fig. 8C). Comprimento do corpo 11,10–12,23mm (11,56mm) e largura ao nível do ceco intestinal 0,24–0,39mm (0,29mm). Extremidade cefálica arredondada com três lábios subdesenvolvidos, um lábio com um pequeno dente larval (figs. 7D e 8C, D). Poro excretor situado abaixo do dente cefálico ventral de 0,04–0,05mm (0,05mm) de comprimento (fig. 7D). Anel nervoso localizado a 0,18–0,28mm (0,25mm) da extremidade anterior (fig. 7D). Comprimento do esôfago 1,63–1,89mm (1,76mm) e largura 0,06–0,16mm (0,10mm) (fig. 7D). Ventrículo pequeno e oval, comprimento 0,03–0,05mm (0,04mm) e largura 0,04–0,06mm (0,05mm) (fig. 7D). Intestino distinto e escuro. Comprimento do apêndice ventricular 0,30–0,37mm (0,34mm) e largura 0,04–0,07mm (0,06mm) (fig. 7D). Comprimento do apêndice ventricular representando 2,76–3,07% do comprimento do corpo. O ceco intestinal é mais longo que o apêndice ventricular, comprimento 0,98–1,30mm (1,08mm) e largura 0,10–0,12mm (0,12mm). O comprimento do ceco intestinal representa 8,86–11,57% do comprimento do corpo. Extremidade posterior com duas glândulas anais (fig. 7E). Cauda cônica com ponta pontiaguda com 0,11–0,13mm (0,13mm) de comprimento (figs. 7E e 8E, F).

Hospedeiro tipo: *Nannopterum brasiliense* (Gmelin, 1789) (Suliformes: Phalacrocoracidae);
Sítio de infecção: Intestino e proventrículo de *N. brasiliense* e intestino de *H. argentinensis*;
Localidade tipo: Lago pampeano, Província de Córdoba, Argentina (33°25'S, 62°54'O);
Prevalência: 50% (um infectado/dois espécimes hospedeiros examinados) em *N. brasiliense*;
100% (um infectado/um espécime hospedeiro examinado) em *H. argentinensis*;
Intensidade: 22 em *N. brasiliense* e quatro em *H. argentinensis*;
Espécimes depositados: Holótipo (espécime macho adulto de *N. brasiliense*, CHIOC 38925a).
Alótipo (espécime fêmea adulto de *N. brasiliense*, CHIOC 38925b). Parátipos: 3 machos
adultos e 2 fêmeas adultas (CHIOC 38925c); 3 L4 de *N. brasiliense* (CHIOC 38925d); e 2 L3
de *H. argentinensis* (CHIOC 38926);
Este artigo foi registrado no Official Register of Zoological Nomenclature (ZooBank)
como: urn: lsid: zoobank.org: act: 1D6178CA-533C-417C-8F27-53E4E72CC3E9;
Etimologia: A nova espécie leva o nome em homenagem a Antônio Jorge de Andrade Sardella,
pai da autora da tese.

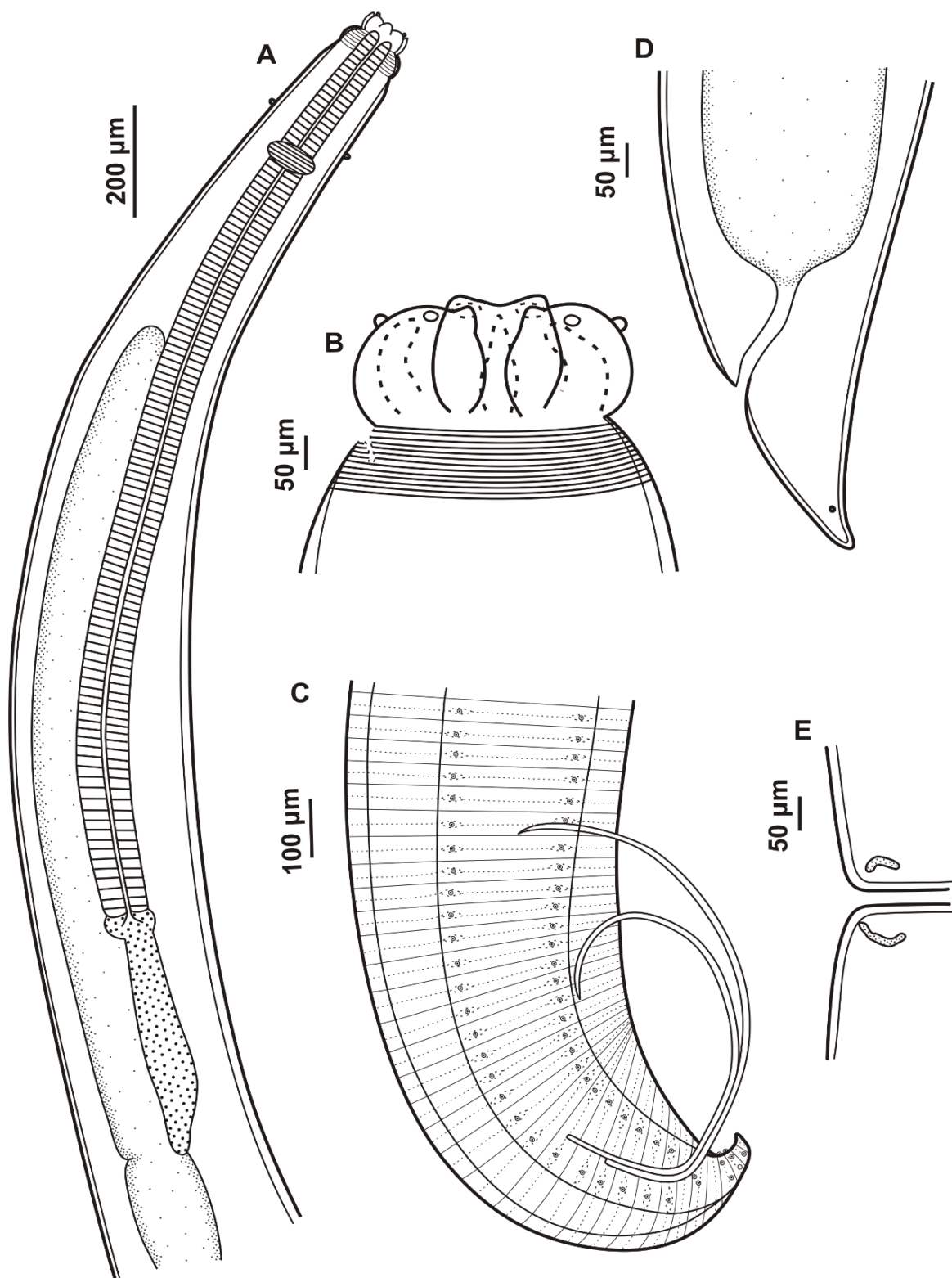


Figura 5. Adultos de *Contracaecum jorgei* (A) Extremidade anterior, vista dorsoventral mostrando lábios, collar cefálico, papila cefálica, anel nervoso, esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular. (B) Lábios dorsal e ventrolateral, interlábio e collar cefálico. (C) Macho, extremidade posterior mostrando distribuição da papila pré e pós-cloacal, espículos e cloaca. (D) Fêmea, extremidade posterior mostrando a cloaca e fasmídeo. (E) Fêmea, região mediana do corpo, vulva.

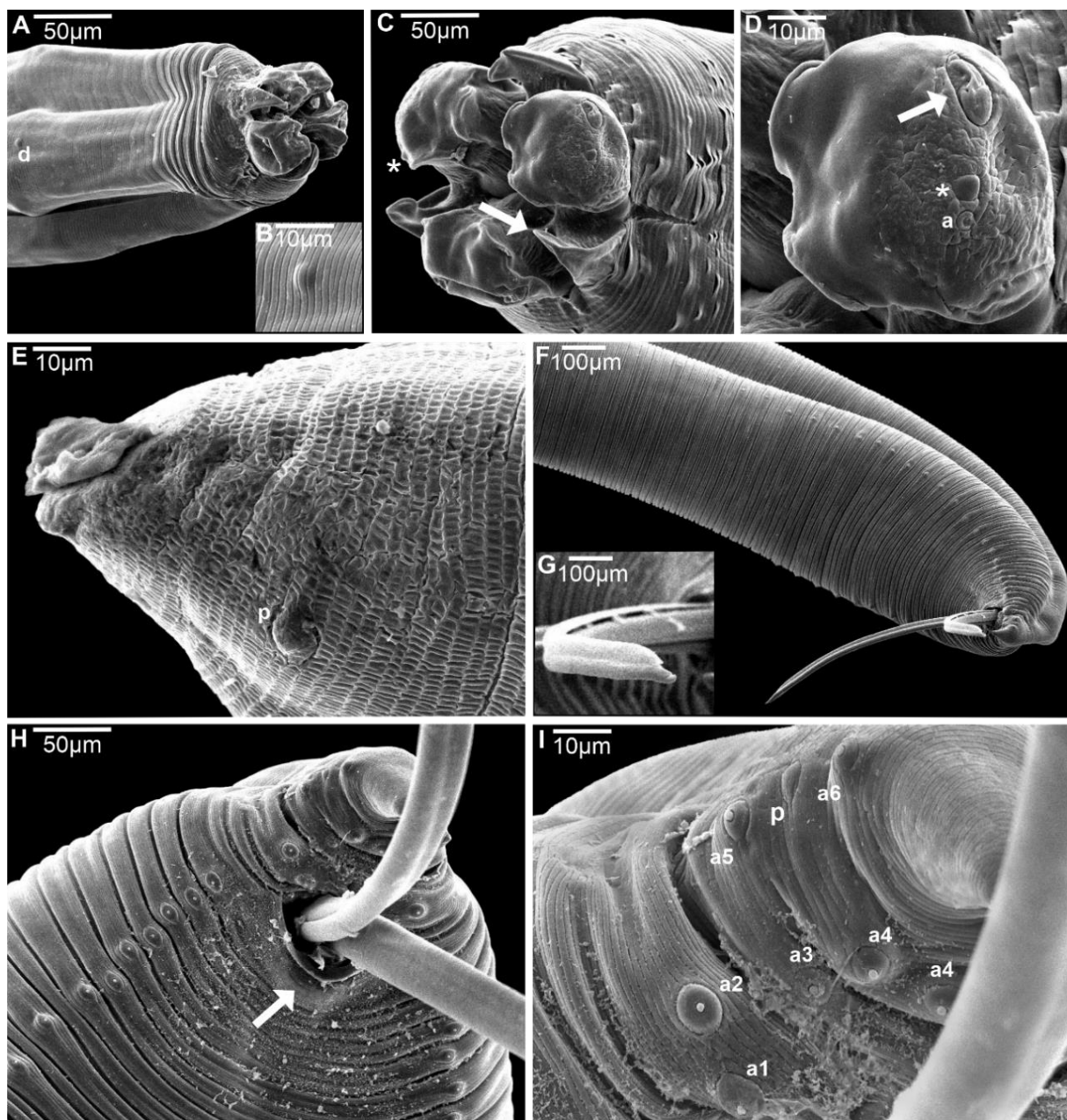


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura de adultos de *Contracaecum jorgei* (A) Macho, extremidade anterior, vista lateral mostrando colar cefálico e deirídeos. (B) Detalhe mostrando os deirídeos. (C) Feminino, extremidade anterior mostrando lábios dorsal e ventrolateral, interlábio (seta) e fosseta sensorial (*). (D) Lábio ventrolateral da fêmea mostrando uma papila dupla grande (seta), uma papila externa-lateral (*) e anfídeo (a). (E) Fêmea, extremidade posterior mostrando cauda cônica com ponta pontiaguda. (F) Macho, extremidade posterior mostrando papilas pré e pós-cloacais, espículos e cauda cônica com ponta pontiaguda. (G) Extremidade distal do espículo, vista lateral. (H) Macho, vista ventral, extremidade posterior mostrando papilas pré-cloacais, papilas pós-cloacais e papila mediana (seta). (I) Macho, visão ventral mostrando papilas pós-cloacais. Abreviaturas: d, deirídeo; p, fasmídeo; a1, par de papila proximal; a2, par de papila paracloacal; a3 e a4, papilas subventrais distais; a5 e a6, papilas sublaterais distais.

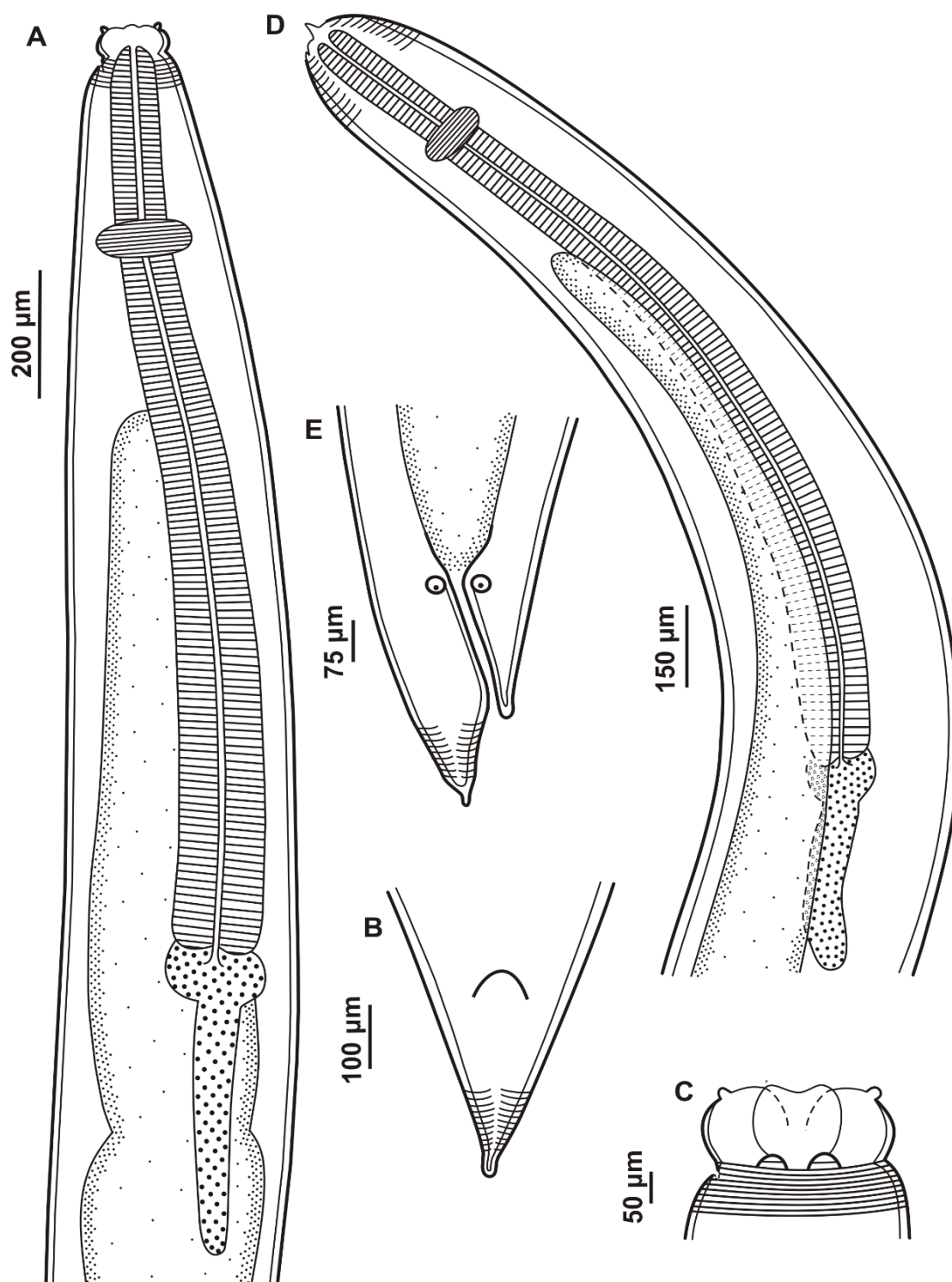


Figura 7. Larvas de *Contracaecum jorgei* (A) L4, extremidade anterior, vista lateral mostrando collar cefálico, papila cefálica, anel nervoso, esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular. (B) L4, extremidade posterior mostrando uma pequena projeção com cutícula estriada transversalmente. (C) L4, lábios dorsal e ventrolateral, collar cefálico e papila cefálica. (D) L3, extremidade anterior, vista lateral mostrando dente larval, cutícula estriada transversalmente, anel nervoso, esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular. (E) L3, extremidade posterior mostrando uma pequena projeção com cutícula estriada transversalmente.

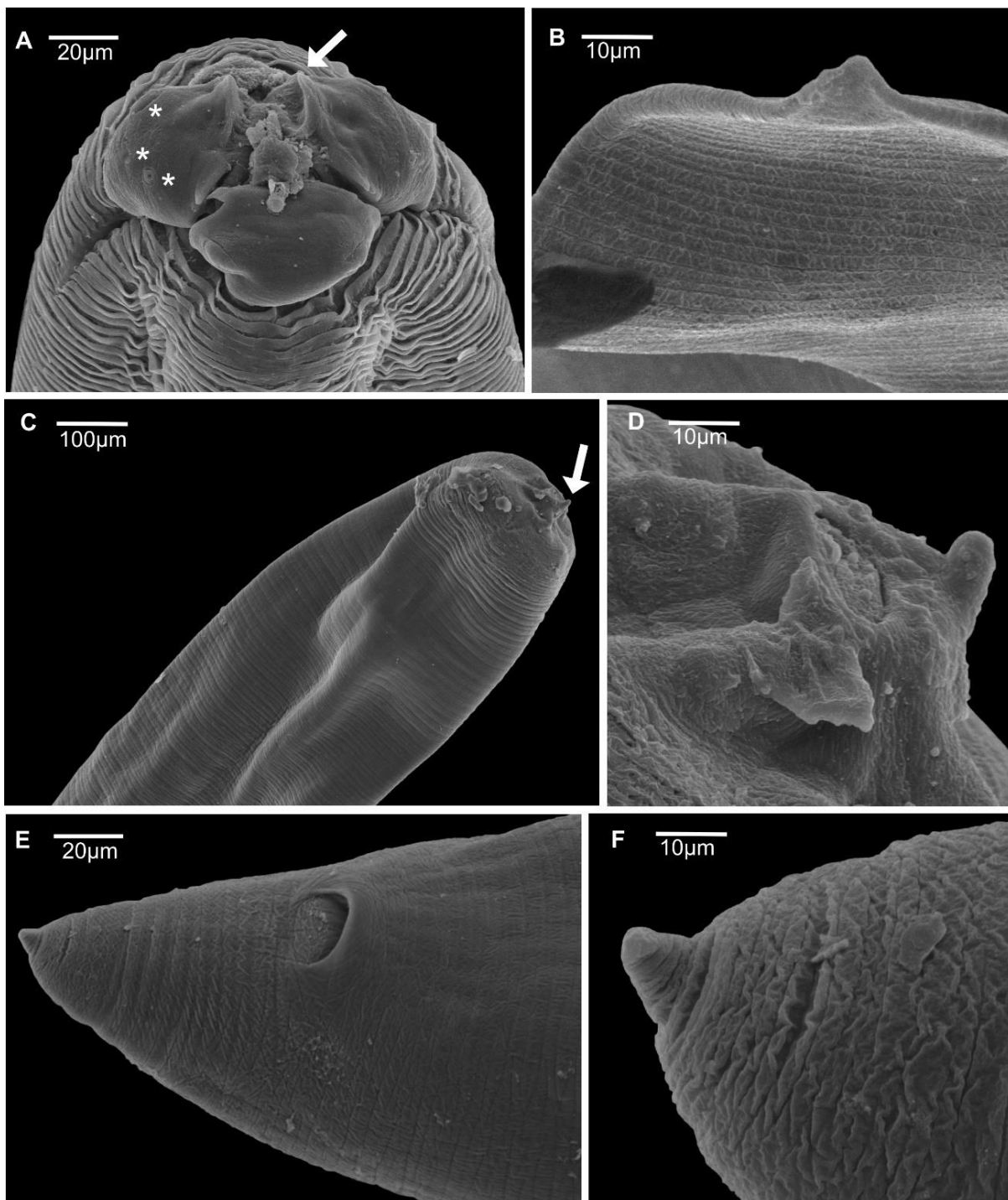


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura dos estágios larvais de *Contracaecum jorgei* (A) L4, extremidade anterior, vista lateral mostrando extremidade cefálica arredondada com três lábios bem desenvolvidos (um dorsal e dois ventrolaterais), aurículas (seta) e papilas cefálicas do lábio ventrolateral. (B) L4, extremidade posterior mostrando cauda cônica com ponta pontiaguda. (C) L3, extremidade anterior, vista lateral mostrando a extremidade cefálica arredondada com um lábio com pequeno dente larval (seta). (D) L3, detalhe mostrando o dente larval. (E) L3, extremidade posterior mostrando abertura cloacal. (F) L3, detalhe mostrando cauda cônica com ponta pontiaguda.

3.1.2 Molecular e análises filogenéticas

Sequências genéticas de *C. jorgei* foram geradas (519 pb). As comparações da Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico/Emparelhada (BLAST)/ Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) com o conjunto de dados do gene GenBank mt cox-2 confirmaram a espécie como do gênero *Contracaecum*, mas não a identificação da espécie com qualquer *Contracaecum* spp. acessíveis. Distância genética intraespecífica de *C. jorgei* variaram de 0,000 (entre L3 e L4) a 0,004 (entre adultos e L3; entre adultos e L4). As distâncias interespecíficas entre *C. jorgei* e as espécies do clado mais próximo foram 0,105–0,107 (*C. overstreeti*) e 0,118 (*C. gibsoni*). As topologias de árvore produzidas com diferentes critérios de otimalidade (ML e BI) foram semelhantes, com pouca variação nos valores de suporte dos nós (fig. 9). As sequências pertencentes a L3, L4 e adultos de *C. jorgei* eram semelhantes e agruparam formando um clado bem suportado (ML = 100%; probabilidades bayesianas posteriores (BPP) = 100%). *Contracaecum jorgei* formou um grupo irmão com *C. gibsoni* e *C. overstreeti* que era bem suportado (ML = 65%; BPP = 96%).

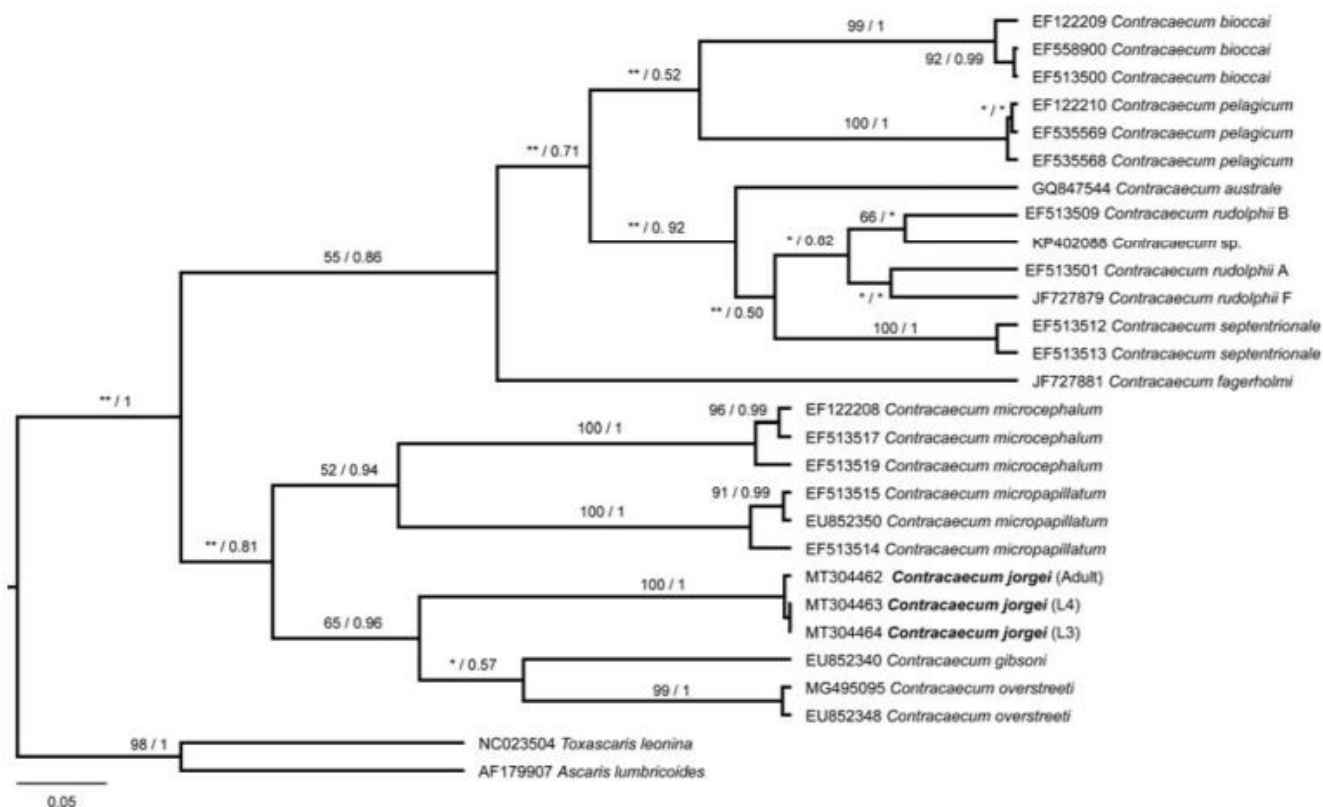


Figura 9. Relações filogenéticas dentro do gênero *Contracaecum* com base no fragmento parcial do gene citocromo c oxidase II. A árvore foi inferida usando a máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (IB) com o modelo HKY + I + G. O suporte nodal é descrito à esquerda por réplicas de bootstrap e à direita pela probabilidade posterior de cada nó representado. * Baixo suporte nodal em ML ou BI; ** incongruência entre ML e BI. A barra de escala representa o número de substituições por site.

3.2 *Contracaecum* n. sp.

Filo Nematoda
Superfamília Ascaridoidea Railliet & Henry, 1915
Família Aniskidae Skrjabin & Karokhin, 1945
Gênero *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912
***Contracaecum* n. sp.**

Descrição

Morfologia geral: Corpo filiforme com estrias cuticulares transversais ao longo do corpo, mais evidentes na região anterior e posterior. Interlábio de formato subtriangular, ponta não bifurcada e ligeiramente mais curto que os lábios (Fig. 10-C; Fig. 11-A) com 2 aurículas conspícuas e lobadas, cada uma com 2 fossas sensoriais proeminentes na extremidade externa (Fig. 10-C; Fig. 11-A, B). Lábio dorsal maior do que os lábios ventrolaterais com 2 grandes papilas duplas sublaterais, cada lábio ventrolateral com uma papila externa lateral grande e abertura separada em forma de poro de anfídeo. Colar cefálico conspícuo projetando-se lateralmente, lembrando espinhos (Fig. 10-A, C; Fig. 11-C). Esôfago com grande ventrículo globular (Fig. 10-A; Fig. 11-D). Poro excretor na base dos lábios (Fig. 10-C). Derídios não visíveis. Ventrículo com apêndice posterior grande, ceco intestinal bem desenvolvido, mais longo que o apêndice ventricular com porção final arredondada (Fig. 10-A; Fig. 11-D). Macho e fêmea apresentando cauda cônica (Fig. 10-B, D, F; Fig. 11-F, G). Cauda da fêmea ligeiramente mais fina que a do macho.

Macho: (baseado no holótipo e 4 parátipos): Comprimento do corpo 7,69–12,90mm (10,99mm), largura no nível do anel nervoso 0,15–0,22mm (0,19mm). Distância da extremidade anterior ao anel nervoso 0,28–0,43mm (0,35mm) (Fig. 10-A; Fig. 11-B). Comprimento do esôfago 1,62–2,96mm (1,99mm) e largura 0,05–0,08mm (0,07mm). Comprimento do ceco intestinal 0,85–2,41mm (1,28mm) e largura 0,06–0,11mm (0,08mm). Relação entre o comprimento do ceco intestinal e o comprimento do corpo 7,33–18,67%. Comprimento do ventrículo 0,07–0,11mm (0,09mm) e largura 0,07–0,10mm (0,09mm). Comprimento do apêndice ventricular 0,52–0,59mm (0,55mm) e largura 0,04–0,06mm (0,05mm). Comprimento do apêndice ventricular representando 4,37–6,88% do comprimento do corpo. Comprimento da cauda 0,12–0,16mm (0,14mm). Extremidade caudal apresentando 27–30 pares de papilas pré-clocais equidistantes, formando 2 linhas subventrais estendendo-se anteriormente. Oito pares de papilas pós-clocais: 3 grandes pares de papilas paraclocais deslocadas assimetricamente (segundo par próximo ao terceiro par, primeiro par ligeiramente anterior ao segundo e terceiro par de papilas) e 5 pares distais de papilas (3 pares subventrais, primeiro par ligeiramente anterior ao segundo par de papilas e 2 pares sublaterais). Um par de fasmídeos situados entre os pares de papilas sublaterais (Fig. 10-B, F; Fig. 11-F). Condições cuticulares na extremidade caudal entre as papilas pré-clocais. Espículos curtos, ponta distal pontiaguda (Fig. 1-B). Comprimento do espículo direito e esquerdo 0,79–0,88mm (0,84mm) (n = 4) e 0,70–0,75mm (0,73mm) (n = 4), representando 6,69–11,01% e 5,82–9,18% do comprimento corporal total (SpL / BL), respectivamente.

Fêmea: (com base no alótipo e 4 parátipos): Comprimento do corpo 6,17–9,44mm (7,81mm) e largura ao nível do anel nervoso 0,14–0,18mm (0,16mm). Distância da extremidade anterior ao anel nervoso 0,28–0,32mm (0,30mm). Comprimento do esôfago 1,27–1,63mm (1,50mm) e largura 0,04–0,06mm (0,05mm). Comprimento do ceco intestinal 0,89–1,14mm (1,00mm) e

largura 0,05–0,08mm (0,06mm). Relação entre o comprimento do ceco intestinal e o comprimento do corpo de 11,18–14,45%. Comprimento do ventrículo 0,08–0,11mm (0,10mm) e largura 0,09–0,10mm (0,10mm). Comprimento do apêndice ventricular 0,47–0,58mm (0,53mm) e largura 0,05–0,08mm (0,07mm). Comprimento do apêndice ventricular representando 6,15–8,13% do comprimento do corpo. Vulva na metade anterior do corpo (Fig. 10-E; Fig. 11-E). Distância da extremidade anterior à vulva 3,51–4,48mm (4,83mm). Proporção da vulva para comprimento corporal 48,31–63,35%. Comprimento da cauda 0,13–0,18mm (0,16mm).

L4: (baseado em 7 parátipos): Nematoides de tamanho curto, branco ou amarelo esbranquiçado. Cutícula estriada transversalmente e mais distinta nas extremidades do corpo (fig. 12-A, B, C). Extremidade cefálica arredondada com três lábios bem desenvolvidos (1 dorsal e 2 ventrolaterais) (Fig. 12-B, D). Lábios com 2 aurículas conspícuas e lobadas, ausência de interlábios (Fig. 12-B, D, E). Lábios lisos, sem estrias cuticulares e auriculares, apresentando papila oval única e anfídeo lateral em cada lábio ventrolateral; colar cefálico bem desenvolvido, onde já nota-se uma projeção lateral em forma de espinhos. Comprimento do corpo 4,49–5,61mm (5,08mm) e largura ao nível do anel nervoso 0,09–0,21mm (0,12mm) (Fig. 12-A). Poro excretor localizado entre os lábios ventrolaterais (Fig. 12-A, B). Distância da extremidade anterior ao poro excretor 0,02–0,03mm (0,02mm). Deirídeos não visíveis. Distância da extremidade anterior ao anel nervoso 0,19–0,24mm (0,21mm). Comprimento do esôfago 0,72–1,06mm (0,92mm) e largura 0,04–0,09mm (0,05mm) (Fig. 12-A, E). Comprimento do ceco intestinal 0,42–0,65mm (0,57mm) e largura 0,03–0,10mm (0,05mm) (Fig. 12-A). Relação entre o comprimento do ceco intestinal e o comprimento do corpo de 9,38–11,85%. Comprimento do ventrículo oval 0,04–0,07mm (0,05mm) e largura 0,03–0,07mm (0,05mm) (Fig. 12-A). Comprimento do apêndice ventricular 0,33–0,45mm (0,39mm) e largura 0,05–0,03mm (0,04mm) (Fig. 12-A). Comprimento do apêndice ventricular representando 6,49–9,20% do comprimento do corpo. Cauda cônica com 0,13–0,15mm (0,14mm) de comprimento (Fig. 12-C, F).

Hospedeiro tipo: *Nannopterum brasilianus* (Gmelin, 1789) (Suliformes: Phalacrocoracidae)

Local de infecção: Estômago glandular

Localidade tipo: Lago urbano, Río Cuarto, Córdoba, Argentina (33°06'S, 64°22'W)

Prevalência: 100% (1 infectado/1 espécime de hospedeiro examinado)

Intensidade: 18

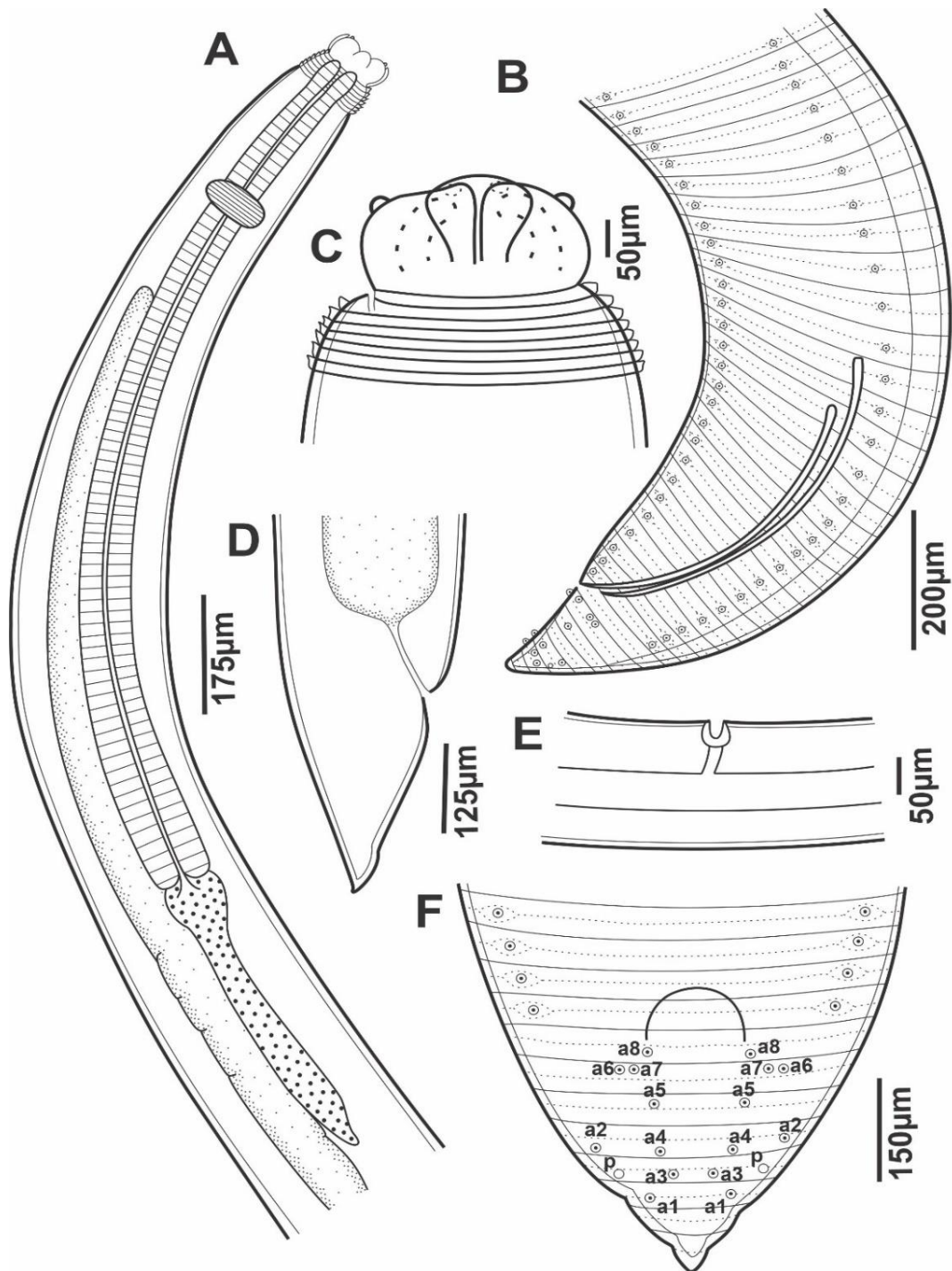


Figura 10. Adultos de *Contracaecum* n. sp. (A) Extremidade anterior, vista lateral mostrando lábios, collar cefálico, papila cefálica, anel nervoso, esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular. (B) Macho, extremidade posterior mostrando distribuição das papilas pré e pós-cloacais, espículos e cloaca. (C) Lábios dorsal e ventrolateral, interlábios e collar cefálico, projetando-se lateralmente, lembrando espinhos. (D) Fêmea, extremidade posterior mostrando cloaca. (E) Fêmea, região mediana do corpo, vulva. (F) Macho, extremidade posterior, vista ventral mostrando a distribuição da papila pós-cloacal. Abreviaturas: p, fasmídeo; a1 e a2, papilas sublaterais distais; a3, a4 e a5, papilas subventrais distais; a6, a7 e a8, papilas paracloacais.

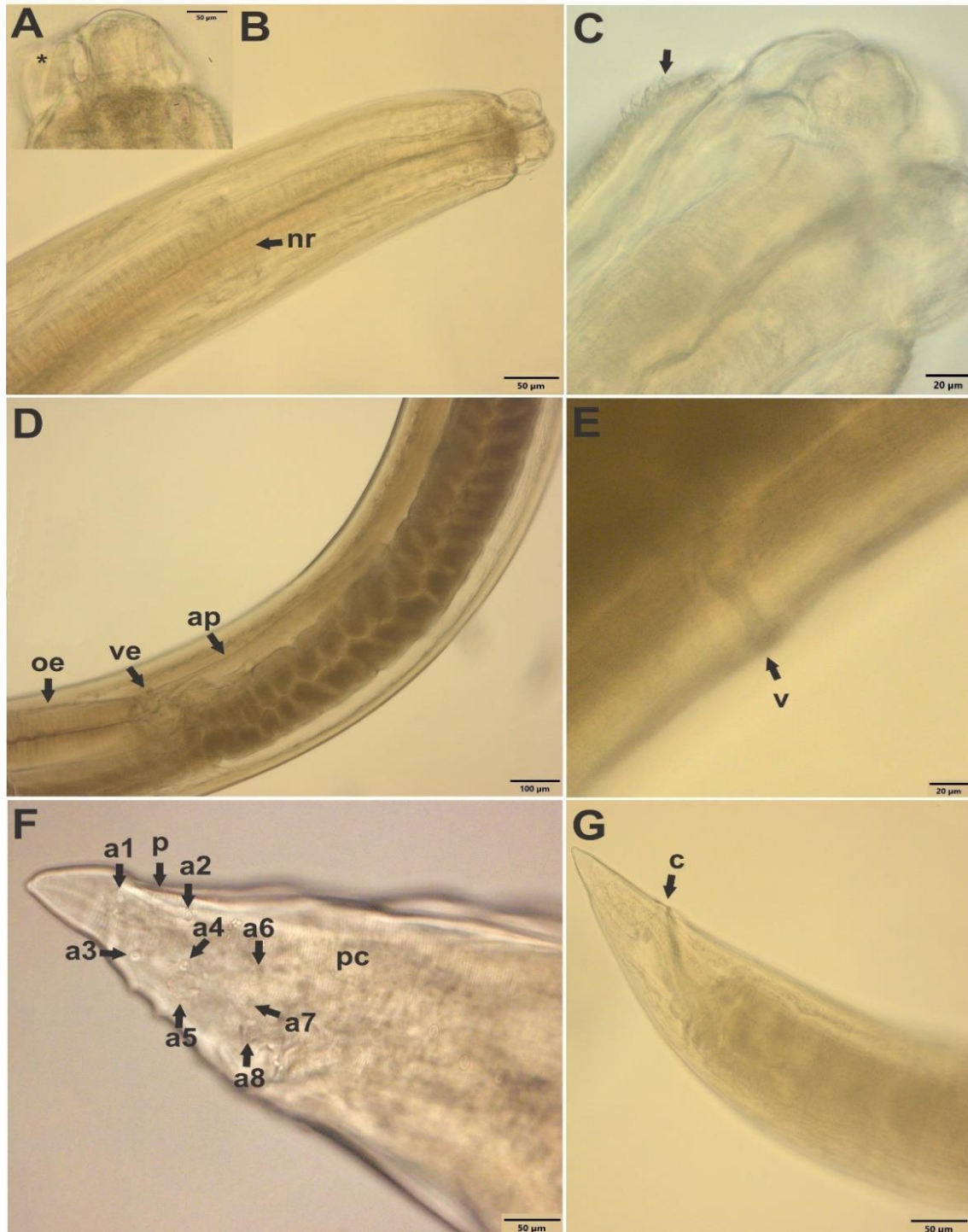


Figura 11. Imagens microscópicas de adultos de *Contracaecum* n. sp. (A) Macho, extremidade anterior mostrando os lábios dorsal e ventrolateral, interlábio (*). (B) Macho, extremidade anterior, vista lateral mostrando collar cefálico e anel nervoso. (C) Lábios dorsal e ventrolateral, interlábio e collar cefálico, projetando-se lateralmente, lembrando espinhos (seta). (D) Macho, corpo mostrando esôfago, ventrículo e apêndice ventricular. (E) Fêmea, vulva. (F) Macho, visão ventral mostrando papilas pós-cloacais. (G) Fêmea, cauda. Abreviaturas: nr, anel nervoso; oe, esôfago; ve, ventrículo; ap, apêndice ventricular; v, vulva; c, cloaca; p, fasmídeo; a1 e a2, papilas sublaterais distais; a3, a4 e a5, papilas subventrais distais; a6, a7 e a8, papilas paracloacais; pc, papilas pré-cloacais.

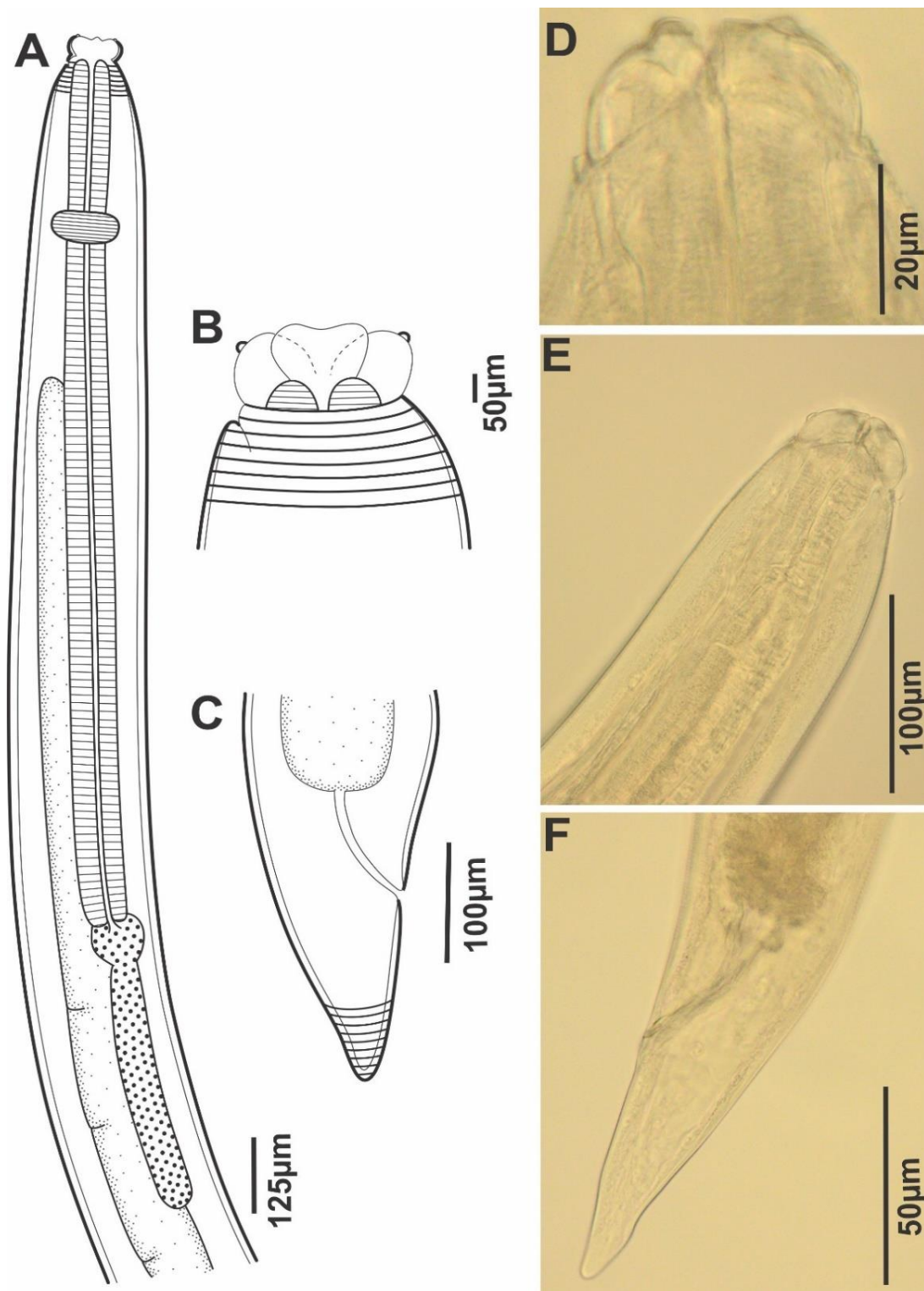


Figura 12. Quarto estágio larval de *Contracaecum* n. sp. (A) Extremidade anterior, vista lateral mostrando collar cefálico, papila cefálica, anel nervoso, esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular. (B) Lábios dorsal e ventrolateral, collar cefálico e papila cefálica. (C) Extremidade posterior mostrando pequena projeção com cutícula estriada transversalmente; Imagens microscópicas do quarto estágio larval de *Contracaecum* n. sp. (D) Lábios dorsal e ventrolateral, formação inicial da projeção lateral do collar cefálico e papila cefálica. (E) Lábios dorsal e ventrolateral. (F) Extremidade posterior.

4. DISCUSSÃO

De acordo com os caracteres morfológicos considerados diagnósticos para as espécies de *Contracaecum*, ou seja, esôfago dotado de ventrículo, presença de apêndice ventricular posterior, ceco anterior, poro excretor situado ao nível da base dos lábios e adultos apresentando interlábio (MORAVEC, 1998), as duas espécies propostas neste trabalho, *C. jorgei* e *Contracaecum* n. sp., coletadas em *N. brasiliensis* são atribuídas ao gênero.

Atualmente, existem 28 espécies, incluindo as espécies presentes neste estudo, pertencentes ao gênero *Contracaecum* nas Américas, parasitando principalmente aves das famílias Phalacrocoracidae e Pelecanidae (Garbin, 2009) (Tabela 1). Na Argentina, há um total de nove espécies de *Contracaecum* que parasitam mamíferos marinhos e outras espécies de aves além de *P. brasiliensis*: *C. spheniscus* Boero & Led, 1970 e *C. pelagicum* Johnston & Mawson, 1942 parasitando *Spheniscus magellanicus* Forster, 1781; *C. osculatum* Rudolphi, 1802 e *C. mirounga* Nikolskiy, 1974 encontrado em *Mirounga leonina* Linnaeus, 1758; *C. ogmorhini* (= *corderoi*) Johnston & Mawson, 1941 relatado em *Mirounga leonina* e *Arctocephalus australis* Zimmermann, 1783; *C. microcephalum* (= *spiculigerum*) Rudolphi, 1809 em *Nycticorax nycticorax* (Linnaeus, 1758) e *Nycticorax caledonicus* Gmelin, 1789; *C. macronectidis* Schuurmans-Stekhoven, 1950 em *Macronectes giganteus* Gmelin, 1789; *C. multipapillatum* von Drasche 1882 em *Ardea alba* Linnaeus, 1758, *Egretta thula* Molina, 1782 e *Bubulcus ibis* Linnaeus, 1758 e *C. travassosi* Gutierrez, 1943 em *Phalacrocorax albiventer* Lesson, 1831. Estes dados retratam a grande diversidade de hospedeiros e espécies pertencentes ao gênero *Contracaecum*, encontrados na Argentina.

Ao comparar *C. jorgei* com as demais espécies descritas de *N. brasiliensis*, as espécies *C. rudolphii*, *C. australe* e *C. travassosi* são as mais semelhantes quanto à morfometria do esôfago, ceco intestinal e número e distribuição das papilas caudais. No entanto, eles podem ser distinguidos pelo tamanho dos espículos. A nova espécie tem espículos subiguais e mais curtos do que *C. australe* e *C. travassosi*, que têm espículos iguais e longos (9,60–15,88mm e 7,70–11,10mm, respectivamente). Além disso, *C. rudolphii* pode ser distinguido da nova espécie por ter espículos maiores e desiguais (direito 4,50–7,50mm e esquerdo 5,90–8,20mm), enquanto *C. multipapillatum* apresenta espículos iguais e menores (0,89–1,11mm e 0,90–1,09mm) do que a espécie nova (direito 3,63–2,28mm e esquerdo 3,18–2,03mm) e um maior número de papilas caudais (32–93 em *C. multipapillatum*; 61 em *C. caballeri* e 32 em *C. jorgei*). *Contracaecum rudolphii*, *C. australe* e *C. caballeri* podem ser separados da nova espécie pela forma do interlábio e arranjo das papilas cefálicas. *Contracaecum rudolphii* e *C. australe* apresentam bifurcação na extremidade distal do interlábio, duas papilas duplas no lábio dorsal, uma papila dupla e um anfídeo em cada lábio ventrolateral, enquanto *C. caballeri* possui duas papilas grandes no lábio dorsal e duas papilas em cada lábio ventrolateral (uma ventral grande e uma lateral menor). Em contraste, *C. jorgei* apresenta interlábios sem bifurcação com o mesmo comprimento dos lábios e uma pequena papila adicional em cada lábio ventrolateral.

Por outro lado, *C. multipapillatum* e *C. caballeri* são diferenciados de *C. jorgei* por ter interlábio menor que os lábios, comprimento mais longo (20,63–32,34mm em *C. multipapillatum*; 24,29–26,97mm em *C. caballeri*; 14,31–20,98mm na nova espécie) e apêndice ventricular mais longo (0,47–0,69mm; 0,51–0,61mm vs. 0,29–0,57mm na nova espécie). Além disso, *C. multipapillatum* tem um esôfago mais longo (2,60–4,62mm vs. 2,01–3,88mm na nova espécie) e ventrículo também mais longo que em *C. jorgei* (0,12–0,23mm vs.

0,03–0,09mm na nova espécie), enquanto *C. caballeroi* tem uma cauda cônica sem ponta pontiaguda (LENT & FREITAS, 1948; AMATO *et al.*, 2006; GARBIN *et al.*, 2011; VIOLANTE-GONZÁLEZ *et al.*, 2011).

Outras espécies de *Contracaecum* relatadas nos continentes americanos têm algumas semelhanças com *C. jorgei*. *Contracaecum margolisi* Mattiucci, Cianchi, Nascetti, Paggi, Sardella, Timi, Webb, Bastida, Rodríguez & Bullini, 2003 encontrado em *Zalophus californianus* do Canadá, *Contracaecum fagerholmi* D'Amelio, Cavallero, Dronen, Barros e Paggi, 2012 e *C. rudolphii* D'Amelio Cavallero, Dronen, Barros e Paggi, 2012 encontrados em *Pelecanus occidentalis* do Texas, *Contracaecum bioccai* Mattiucci, Paoletti, Olivero-Verbel, Baldiris, Arroyo-Salgado e Garbin, 2008 encontrado em *P. occidentalis* da Colômbia e *Contracaecum mirounga* Nikolskiy, 1974 encontrados em *Spheniscus magellanicus* da Argentina têm o mesmo número e arranjo de papilas cefálicas que *C. jorgei*. Possuem também ponta distal do interlábio não bifurcada, exceto *C. rudolphii* F e *C. bioccai*.

Contracaecum jorgei mais se assemelha a *C. mirounga* devido ao comprimento do corpo (14,31–20,98mm vs. 15,60–18,60mm, respectivamente), distância da extremidade anterior ao anel nervoso (0,29–0,46mm vs. 0,35–0,43mm) e tamanho e formato da cauda (0,15–0,21mm vs. 0,19–0,23mm).

No entanto, *C. jorgei* tem espículos muito menores (direito 2,28–3,63mm; esquerdo 2,03–3,18mm) do que as outras espécies: *C. fagerholmi* (espículos iguais em comprimento, 4,15–4,85mm); *C. rudolphii* F (espículos iguais em comprimento 5,96–7,30mm); *C. bioccai* (direito 6,00–6,50mm; esquerdo 5,80–6,20mm); *C. mirounga* (direito 8,12–10,71mm; esquerdo 5,89–10,59mm); e *C. margolisi* (direito 6,10mm; esquerdo 6,30mm). O número de papilas pós-cloacais de *C. jorgei* é maior do que *C. bioccai* (seis vs quatro) e menor que *C. mirounga* (seis vs 13 pares), enquanto *C. fagerholmi* e *C. margolisi* têm o mesmo número de papilas pós-cloacais e uma única papila mediana na borda anterior da cloaca (MATTIUCCI *et al.*, 2003, 2008; D'AMELIO *et al.*, 2012; GARBIN *et al.*, 2019).

As espécies presentes formaram um clado bem suportado com o grupo irmão *C. gibsoni* Mattiucci, Paoletti, Solorzano e Nascetti, 2010 e *C. overstreeti* Mattiucci, Paoletti, Solorzano e Nascetti, 2010, mas é geneticamente e morfologicamente distinto. As sequências de *C. gibsoni* (EU852340) e *C. overstreeti* (EU852348) foram obtidas de vermes adultos recuperados de *Pelecanus crispus* (L.) na Grécia e *C. overstreeti* (MG495095) foi obtida de larvas infectando *Mugil cephalus* na Turquia (Mattiucci *et al.*, 2010; Pekmezci & Yardimci, 2019). Os adultos de *C. gibsoni* e *C. overstreeti* são maiores que *C. jorgei* n. sp. (30,00–47,00mm; 44,00–50,00mm vs. 14,31–20,98mm), mas eles se assemelham a *C. jorgei* pela disposição e número de papilas cefálicas e ausência de interlábios bifurcados. Essas espécies diferem da espécie nova por apresentar espículos menores (*C. gibsoni*: direito 2,15–2,30mm e esquerdo 2,10–2,30mm; *C. overstreeti*: direito 2,78–2,86mm e esquerdo 2,90–3,15mm vs. direito 3,63–2,28mm e esquerdo 3,18–2,03mm) e o número e disposição das papilas caudais. *Contracaecum gibsoni* tem 65–68 pares de papilas pós-cloacais, enquanto *C. overstreeti* apresenta 61–65 pares de papilas pós-cloacais. Além disso, ambas as espécies diferem da espécie presente por terem quatro pares de papilas proximais posteriores à cloaca, um único par de papilas paracloacais duplas, quatro pares de papilas distais e um único par de fasmídeos semelhantes a papilas muito pequenas.

As larvas de *C. overstreeti* diferem das larvas de *C. jorgei* por apresentarem tamanho maior (20,10–22,60mm vs. 11,10–12,23mm), maior comprimento do esôfago (2,23–2,91mm vs. 1,63–1,89mm), apêndice ventricular (0,78–0,82mm vs. 0,30–0,37mm), ceco intestinal (2,18–2,22mm vs. 0,98–1,30mm) e cauda mais longa (0,22–0,23mm vs. 0,11–0,13mm). Além disso, a cauda das larvas de *C. overstreeti* possui extremidades pontiagudas com espinhos, distinguindo-as de *C. jorgei*.

Existem vários registros de L3 de *Contracaecum* em peixes de água doce da região atlântica da América do Sul, alguns deles incluindo uma descrição dos morfotipos (MORAVEC *et al.*, 1993; MARTINS *et al.*, 2005; LUQUE *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2019 no Brasil e MANCINI *et al.*, 2014 na Argentina). Moravec *et al.* (1993) descreveram a larva tipo 1 de *Contracaecum* parasitando *Hoplias malabaricus* no rio Paraná, Brasil, mas este morfotipo apresenta claras diferenças morfométricas em relação à nova espécie (comprimento total, comprimento do esôfago e comprimento do ceco intestinal são maiores na nova espécie, enquanto o comprimento do ventrículo é menor). Martins *et al.* (2005) descreveram larvas de *Contracaecum* parasitando *H. malabaricus* no norte do Brasil com características morfométricas semelhantes às larvas tipo 2 descritas por Moravec *et al.* (1993). O L3 da nova espécie pode ser separado do tipo 2 e das larvas descritas por Martins *et al.* (2005) devido ao menor comprimento do corpo, esôfago e ceco intestinal, embora possua ventrículo maior. As larvas de *Contracaecum* relatadas por Mancini *et al.* (2014) parasitando nove espécies de peixes de água doce na Argentina, incluindo *H. malabaricus*, foram identificados como tipo 2 (Moravec *et al.*, 1993), mas os autores não apresentaram informações morfométricas para permitir a comparação com *C. jorgei*. Infelizmente, não há informações moleculares disponíveis sobre as larvas utilizadas na comparação morfológica, o que poderia ajudar a determinar sua identificação específica.

A morfologia de L4 de *Contracaecum* não foi descrita em detalhes até agora. Torres *et al.* (2000) apontaram para a dificuldade de distinguir larvas L4 de adultos imaturos, mas estes últimos poderiam ser reconhecidos pela presença de papilas caudais, espículos em machos e vulvas bem desenvolvidas em fêmeas. Além disso, a principal característica para distinguir L4 dos adultos é a ausência de interlábios, conforme confirmado por descrições morfológicas de L4 em outras espécies de *Contracaecum* (KREIS, 1955; MCCLELLAND & RONALD, 1973; SEMENOVA, 1974; FAGERHOLM *et al.*, 1996; GARBIN *et al.*, 2007, 2008; KANAREK & BOHDANOWICZ, 2009) e de acordo com as características observadas na L4 do presente estudo.

Segundo Kanarek & Bohdanowicz (2009), a falta de análises abrangentes usando técnicas moleculares para confirmar os critérios morfológicos é um desafio para a identificação de larvas de *Contracaecum*. Ao integrar estudos morfológicos e moleculares dos estágios L3, L4 e adultos isolados de uma ampla gama de espécies de peixes (hospedeiros intermediários) e aves e mamíferos marinhos (hospedeiros definitivos), será possível identificar estágios larvais específicos de algumas espécies de *Contracaecum*. Existem apenas algumas descrições taxonômicas de L3 e L4 de *Contracaecum* e estudos usando técnicas moleculares para identificação larval, apesar da alta prevalência encontrada em hospedeiros intermediários na Argentina relatada nos últimos anos (Mancini *et al.*, 2014). Além disso, nos últimos 20 anos, técnicas moleculares têm sido ferramentas importantes para a identificação de espécies, principalmente para estágios larvais de *Anisakis*, *Pseudoterranova* e *Contracaecum*, uma vez que as características morfológicas não são suficientes para distinguir definitivamente as espécies (MATTIUCCI & NASCETTI, 2008; MATTIUCCI *et al.*, 2008; GARBIN *et al.*, 2013). No ciclo de vida de *Contracaecum*, os ovos eclodem e se desenvolvem em larvas de segundo estágio ou L3 na água. Estes são ingeridos por artrópodes aquáticos e infectam a cavidade corporal de peixes de água doce e marinhos ao ingerir os artrópodes aquáticos infectados (DZIEKOŃSKA-RYNKO & ROKICKI, 2007). É provável que microcrustáceos e peixes possam atuar como hospedeiros intermediários (MORAVEC, 2009), assim, a alta disponibilidade de zooplâncton e densidade de peixes registrada em lagos pampeanos rasos na Argentina (MANCINI & GROSMAN, 2008) podem aumentar o suprimento de alimento para as aves, aumentando a chance de infectar o hospedeiro definitivo. No estômago das aves, as larvas L3 se desenvolvem para L4 e, posteriormente, tornam-se adultas com dimorfismo sexual

(KØIE & FAGERHOLM, 1995). Os humanos podem ser infectados acidentalmente ao consumir peixe cru contendo L3 de *Contracaecum*, conforme mostrado por Nagasawa (2012) com a espécie *C. osculatum*. As larvas podem penetrar nas paredes do estômago e do intestino, causando uma condição potencialmente fatal que causa dores de estômago, febre, diarreia e vômitos (DORNY *et al.*, 2009). Além disso, sabe-se que os nematoides, tanto larvas quanto adultos, podem afetar negativamente a saúde do hospedeiro e causar sérias perdas à pesca (DICK *et al.*, 1987). Por esse motivo, uma identificação precisa das espécies de larvas infectantes de *Contracaecum* encontradas em peixes usados para consumo humano é muito importante (KANAREK & BOHDANOWICZ, 2009). O uso de técnicas moleculares é fundamental não apenas para definir o status taxonômico dessas espécies, mas também para o seu reconhecimento. Devido à sua maior taxa de mudança de base e à variabilidade genética observada no gene *mt cox-2*, o torna melhor do que genes ribossomais (CEBALLOS-MENDIOLA *et al.*, 2010; MATTIUCCI *et al.*, 2014) para identificação de espécies. A relação direta entre adultos e estágios larvais de *C. jorgei* e a variação interespecífica encontrada neste estudo mostra que *mt cox-2* pode ser uma ferramenta valiosa para a identificação de espécies dentro do gênero (JEX *et al.*, 2008; BORGES *et al.*, 2014). Portanto, devido à biodiversidade de nematoides Anisakidae, a análise de marcadores genéticos moleculares tem se mostrado uma ferramenta eficiente para o diagnóstico específico e identificação inequívoca de nematoides anisquídeos com potencial zoonótico (KANAREK & BOHDANOWICZ, 2009). Este é um requisito essencial para levantamentos epidemiológicos. Assim, as análises filogenéticas indicam que *C. jorgei* pertence a uma linhagem independente das outras espécies de *Contracaecum*, confirmando-a como uma espécie separada e nova.

Ao comparar a espécie *Contracaecum* n. sp., também proposta nesse trabalho, com as seis espécies de *Contracaecum* descritas em *N. brasiliensis* da América, incluindo *C. jorgei*, *C. rudolphii*, *C. australe*, *C. travassosi*, *C. multipapillatum* e *C. caballeroi*, *Contracaecum* n. sp. podem ser distinguidos entre estes por um comprimento corporal mais curto e esôfago, ceco intestinal e apêndice ventricular menores. No entanto, a espécie presente apresenta apêndice ventricular ligeiramente mais longo que *C. jorgei* e *C. multipapillatum*. Além disso, a nova espécie apresenta comprimento de ventrículo semelhante a *C. multipapillatum* e *C. caballeroi* e maior que *C. jorgei*.

Contracaecum n. sp. é semelhante a *C. jorgei* e *C. multipapillatum* quanto à distância do anel nervoso da região anterior e se diferencia de *C. australe*, *C. travassosi* e *C. caballeroi* pela menor distância da região anterior. Além disso, *C. jorgei*, *C. rudolphii*, *C. australe*, *C. travassosi*, *C. multipapillatum* e *C. caballeroi* podem ser distinguidos das novas espécies por terem espículos maiores (Tabela 2).

Contracaecum rudolphii, *C. australe* e *C. travassosi* podem ser distinguidos da nova espécie pela forma do interlábio e arranjo das papilas cefálicas. *Contracaecum australe* e *C. travassosi* apresentam bifurcação na extremidade distal do interlábio, duas papilas no lábio dorsal e uma grande papila em cada lábio ventrolateral, enquanto *C. rudolphii* possui além da bifurcação na extremidade distal do interlábio, duas grandes papilas sublaterais duplas no lábio dorsal, uma papila dupla e anfídeo em cada lábio ventrolateral. *Contracaecum jorgei*, *C. multipapillatum* e *C. caballeroi* são os mais semelhantes a *Contracaecum* n. sp. uma vez que apresentam interlábio com ponta não bifurcada. Porém, *C. jorgei* se diferencia por apresentar interlábios do mesmo tamanho dos lábios, enquanto *C. caballeroi* e *C. multipapillatum* apresentam interlábio um pouco menor, assim como *Contracaecum* n. sp.. *Contracaecum* n. sp., *C. jorgei* e *C. caballeroi* apresentam duas grandes papilas duplas no lábio dorsal. Mas, *Contracaecum jorgei*, apresenta em cada lábio ventrolateral uma pequena papila externo-lateral, anfídeo e duas grandes papilas duplas e *C. caballeroi* se distingue por apresentar duas papilas em cada lábio ventrolateral (uma grande ventral e uma lateral menor). Já *Contracaecum*

n. sp. tem em cada lábio ventrolateral uma grande papila externa lateral e anfídeo (LUCKER, 1941; GUTIÉRREZ, 1943; LENT & FREITAS, 1948; AMATO *et al.*, 2006; GARBIN *et al.*, 2011; SARDELLA *et al.*, 2020). Além disso, *C. multipapillatum* e *C. caballeroi* podem ser distinguidos de *Contracaecum* n. sp. por apresentar maior número de pares de papilas pré-clocais (Tabela 2). *Contracaecum jorgei*, *C. rudolphii*, *C. australe* e *C. travassosi* se assemelham às espécies atuais por terem o mesmo número de papilas pré-clocais, no entanto, *Contracaecum* n. sp. apresenta maior número de papilas pós-clocais (Tabela 2).

Embora *Contracaecum* n. sp. tenha algumas estruturas menores em comparação com outras espécies, ou seja, comprimento do corpo, esôfago, ceco intestinal e apêndice ventricular, são consideradas grandes em relação ao seu próprio tamanho. Além das características mencionadas acima, *Contracaecum* n. sp. apresenta tamanho de ICL: BL e VAL: BL maior do que o apresentado por *C. jorgei*, encontrado no mesmo hospedeiro e na mesma região (Tabela 2).

Algumas espécies relatadas no continente americano como *C. quincuspis* Lucker, 1941 encontrado em *Anhinga anhinga* dos Estados Unidos da América, *C. variegatum* (= *yamaguti*) Rudolphi, 1809 encontrado em *Anous hawajiensis* no Havaí e *C. plagiaticum* Lent & Freitas, 1948 encontrado em *Nycticorax nycticorax* no Uruguai apresentam semelhanças no tamanho corporal com *Contracaecum* n. sp. (12,1mm; 6,02-8,73mm; 12,46-16,75mm vs. 7,69-12,90mm), em distância da extremidade anterior ao anel nervoso (0,38mm; 0,27-0,34mm; 0,34-0,38mm vs. 0,28-0,43mm) e no tamanho do ventrículo (0,10mm; 0,06-0,12mm; 0,09-0,13mm vs. 0,07-0,11mm). Embora *Contracaecum* n. sp. se assemelhe a *C. plagiaticum* e *C. variegatum* no comprimento do esôfago (1,62-2,96mm; 1,10-1,79mm vs. 1,96-2,92mm), *Contracaecum* n. sp. apresenta esôfago menor quando comparado com *C. quincuspis* (1,62-2,96mm vs. 4,06mm). No entanto, considerando o comprimento do apêndice ventricular e ceco intestinal, a nova espécie é menor do que *C. quincuspis* (0,52-0,59mm vs. 0,95mm; 0,85-2,41mm vs. 3,34mm) e ligeiramente maior em comparação com *C. variegatum* (0,52-0,59mm vs. 0,36-0,45mm; 0,85-2,41mm vs. 0,60-0,92mm).

Contracaecum n. sp. apresenta espículos de tamanhos diferentes e menores quando comparada a *C. quincuspis*, *C. plagiaticum* e *C. variegatum* que possuem os espículos esquerdo e direito do mesmo tamanho (direito: 0,79-0,88mm e esquerdo: 0,70-0,75mm vs. 2,83mm; 2,32-3,49mm; 1,08-2,70mm). A nova espécie também difere no número de papilas caudais. *Contracaecum quincuspis* apresenta 40 pares de papilas pré-clocais e 6 pares de papilas pós-clocais, *C. plagiaticum* apresenta 18-23 pares de papilas pré-clocais e 8 pares de papilas pós-clocais e *C. variegatum* apresenta 28-33 pares de papilas pré-clocais e 7 pares de papilas pós-clocais, enquanto a nova espécie tem 27-30 pares de papilas pré-clocais, 8 pares de papilas pós-clocais e 1 par de fasmídeos (LUCKER, 1941; LENT & FREITAS, 1948; NAGASAWA, 1998).

A morfologia das larvas de quarto estágio (L4) ainda não foi descrita com muitos detalhes, e a literatura mostra dificuldades em diferenciar essas larvas de adultos maduros (TORRES *et al.*, 2000). No entanto, como já foi dito, adultos maduros podem ser diferenciados pela presença de papilas caudais, espículos nos machos e vulvas bem desenvolvidas nas fêmeas, enquanto L4 pode ser diferenciada pela estrutura da boca, sendo esta, sua principal característica. Apresentam três lábios distintos sem interlábio, como apontado em descrições morfológicas feitas por Kreis (1955), McClelland & Ronald (1973), Semenova (1974), Fagerholm *et al.* (1996), Garbin *et al.* (2007; 2008), Kanarek & Bohdanowicz (2009) e Sardella *et al.* (2020).

Comparando L4 de *Contracaecum* sp. descrito em *Spheniscus magellanicus* Forster, 1781 (GARBIN, 2007) e *Phalacrocorax carbo* Blumenbach, 1798 (KANAREK & BOHDANOWICZ, 2009), *C. jorgei* em *N. brasiliensis* (SARDELLA *et al.*, 2020), o L4 da nova

espécie apresentada neste estudo, é mais semelhante ao *Contracaecum* sp. descrito por Kanarek & Bohdanowicz (2009) devido à morfometria do corpo, esôfago, ceco intestinal, cauda e distância do anel nervoso à extremidade anterior. Em contraste, difere de *C. jorgei* pelo menor comprimento de estruturas como esôfago, ceco intestinal, ventrículo e apêndice ventricular (Tabela 3).

As larvas de *Contracaecum* são um problema de saúde pública (NAGASAWA, 2012). O complexo ciclo de vida do *Contracaecum* consiste em quatro estágios larvais e envolve copépodos, vertebrados aquáticos e peixes como hospedeiros intermediários e/ou paratênicos. No estômago do hospedeiro definitivo, a larva de terceiro estágio passa a ser larva de quarto estágio (MORAVEC, 2009). Tanto as larvas quanto os adultos podem afetar negativamente a saúde do hospedeiro. As larvas podem ser ingeridas acidentalmente por humanos ao consumir carne de peixe crua ou mal cozida, causando anisakiase, uma infecção zoonótica caracterizada por dores de estômago, febre, diarreia e vômitos (ABOLLO *et al.*, 2001; DORNY *et al.*, 2009). Portanto, a identificação dessas larvas torna-se cada vez mais importante, principalmente em peixes que se destinam ao consumo humano (KANAREK & BOHDANOWICZ, 2009; SARDELLA *et al.*, 2020).

Esses achados mostram que o conhecimento tanto de adultos quanto de larvas de espécies de *Contracaecum* da Argentina ainda é muito limitado, dada a abundância dessas espécies na região (MANCINI *et al.*, 2014). Existem muitos trabalhos ecológicos, mas poucos trabalhos taxonômicos, não permitindo que aconteça o registro de algumas espécies. Por isso é tão importante que trabalhos como este sejam realizados, pois novas descobertas fornecem dados para estudos futuros desse grupo de parasitos, que podem estar presentes em peixes marinhos ao longo de toda a costa, destinados ao consumo humano, facilitando novas pesquisas e alertando sobre os possibilidades de contaminação por anisakiase.

Tabela 1. Espécies de *Contracaecum* que parasitam aves e mamíferos marinhos das Américas

<i>Contracaecum</i> spp.	Hospedeiros	Distribuição na América	Referências
<i>Contracaecum jorgei</i>	<i>Nannopterum brasilianus</i>	Argentina	Presente estudo
<i>Contracaecum</i> n. sp.	<i>Nannopterum brasilianus</i>	Argentina	Presente estudo
<i>C. aduncum</i> Rudolphi, 1802	<i>Gadus morhua</i>	Estados Unidos	Baylis (1920)
<i>C. australe</i> Garbin, Mattiucci, Paoletti, González-Acuña & Nascetti, 2011	<i>Phalacrocorax brasilianus</i> <i>Phalacrocorax gaimardi</i>	Chile Argentina	Garbin <i>et al.</i> (2011) Biolé <i>et al.</i> (2012) Garbin <i>et al.</i> (2014)
<i>C. bancrofti</i> Johnston & Mawson, 1941	<i>Pelecanus erythrorhynchus</i>	México Texas Estados Unidos	Yamaguti (1961) McDaniel & Patterson (1966) Dronen <i>et al.</i> (2003)
<i>C. bioccai</i> Mattiucci, Paoletti, Olivero- Verbel, Baldiris, Arroyo- Salgado, Garbin, Navone & Nascetti, 2008	<i>Pelecanus occidentalis</i>	Colômbia	Mattiucci <i>et al.</i> (2008a)
<i>C. caballeroi</i> Bravo Hollis, 1939	<i>Anhinga anhinga</i> <i>Phalacrocorax brasilianus</i>	México Uruguai	Bravo Hollis (1939) Gutiérrez (1943) Lent & Freitas (1948)
<i>C. crenulatum</i> Schuurmans-Stekhoven, 1937	<i>Cancroma cochlearia</i>	Brasil	Schuurmans-Stekhoven (1937)
<i>C. chubutensis</i> Garbin, Diaz, Cremonte & Navone, 2008	<i>Phalacrocorax atriceps</i>	Argentina	Garbin <i>et al.</i> (2008)
<i>Contracaecum heardi</i> Mawson, 1953	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Chile	González-Acuña <i>et al.</i> (2008) Brandão <i>et al.</i> (2014)
<i>C. granulosum</i> Schneider, 1866	<i>Fregata magnificens</i>	Brasil	Vicente <i>et al.</i> (1996)
<i>C. macronectidis</i> Schuurmans-Stekhoven, 1950	<i>Macronectes giganteus</i>	Argentina	Schuurmans-Stekhoven (1950)

<i>C. magnipapillatum</i> (syn. <i>magnicollare</i>) Chapin, 1925	<i>Anous minutus</i>	Hawaii	Chapin (1927)
<i>C. margolisi</i> Mattiucci1, Cianchi, Nascetti, Paggi, Sardella, Timi, Webb, Bastida, Rodríguez & Bullini, 2003	<i>Zalophus californianus</i>	Canadá	Mattiucci <i>et al.</i> (2003)
<i>C. mexicanum</i> Flores Barroeta, 1957	<i>Pelecanus occidentalis</i>	México Venezuela Porto Rico	Flores Barroeta (1957) Dyer <i>et al.</i> (2002) Dronen <i>et al.</i> (2003)
<i>C. microcephalum</i> Rudolphi, 1809	<i>Casmerodius albus egretta</i> <i>Nycticorax nycticorax</i> <i>Nycticorax caledonicus</i> <i>Botaurus stellaris</i> <i>Butorides virescens</i> <i>Phalacrocorax africanus</i> <i>Pelecanus erythrorhynchus</i>	Brasil Argentina México Estados Unidos	Walton (1923) Caballero & Peregrina (1938) McDaniel & Patterson (1966) Boero & Led (1972) Dronen <i>et al.</i> (2003)
<i>C. micropapillatum</i> Stossich, 1890	<i>Pelecanus erythrorhynchus</i>	México Estados Unidos	Deardorff & Overstreet (1980) Kinsella <i>et al.</i> (2004)
<i>C. mirounga</i> Nikolskiy, 1974	<i>Mirounga leonina</i> <i>Spheniscus magellanicus</i>	Argentina	Mattiucci <i>et al.</i> (2003) Garbin <i>et al.</i> (2009)
<i>C. multipapillatum</i> von Drasche, 1882	<i>Phalacrocorax brasilianus</i> <i>Mycteria americana</i> <i>Ardea herodias</i> <i>Ardea alba</i> <i>Egretta thula</i> <i>Bobulcus ibis</i> <i>Pelecanus erythrorhynchus</i> <i>Pelecanus occidentalis</i> <i>Anhinga anhinga</i> <i>Mugil cephalus</i>	México Brasil Estados Unidos Argentina Porto Rico Golfo do México	Lucker (1941a) Huizinga (1967) Deardoff & Overstreet (1980) Vidal Martínez (1994) Labriola & Suriano (1996) Navone <i>et al.</i> (2000) Dyer <i>et al.</i> (2002) Dronen <i>et al.</i> (2003) Kinsella <i>et al.</i> (2004)
<i>C. ogmorhini</i> (syn. <i>corderoi</i>) Johnston & Mawson, 1941	<i>Mirounga leonina</i> <i>Zalophus californianus</i> <i>Arctocephalus australis</i> <i>Eumetopias jubatus</i> <i>Arctocephalus australis</i>	Argentina México Uruguai Estados Unidos	Lent & Freitas (1948) Fagerholm & Gibson (1987) Mattiucci <i>et al.</i> (2003) Timi <i>et al.</i> (2003)

<i>C. osculatum</i> Rudolphi, 1802	<i>Mirounga leonina</i>	Argentina	Mattiucci <i>et al.</i> (2003)
<i>C. ovale</i> Linstow, 1907	<i>Podilymbus podiceps</i> <i>Rollandia rolland</i>	Brasil Argentina	Hartwich (1964) Galeano & Tanzola (2012)
<i>C. pelagicum</i> Johston & Mawson, 1942	<i>Thalassarche melanophris</i> <i>Spheniscus magellanicus</i> <i>Sula leucogaster</i> <i>Spheniscus magellanicus</i> <i>Thalassarche melanophris</i> <i>Phalacrocorax albiventer</i> <i>Spheniscus humboldti</i>	Uruguai Brasil Argentina Chile	Lent & Freitas (1948) Portes Santos (1984) Silva <i>et al.</i> (2005) Garbin <i>et al.</i> (2007) Diaz <i>et al.</i> (2010) González-Acuña <i>et al.</i> (2008) Campos <i>et al.</i> (2013)
<i>C. plagiaticium</i> Lent & Freitas, 1948	<i>Nycticorax nycticorax</i> <i>Spheniscus magellanicus</i> <i>Sula l. leucogaster</i>	Uruguai Brasil	Lent & Freitas (1948) Vicente <i>et al.</i> (1996) Campos <i>et al.</i> (2013)
<i>C. quincuspis</i> Lucker, 1941	<i>Anhinga anhinga</i>	Estados Unidos	Lucker (1941b)
<i>C. rodhaini</i> Geddoelst, 1916	<i>Bagrus sp.</i> <i>Clarias sp.</i>	Argentina	Schuermans-Stekhoven (1937)
<i>C. rudolphii</i> (syn. <i>C. spiculigerum</i>) Hartwich, 1964	<i>Phalacrocorax capensis</i> <i>Phalacrocorax brasilianus</i> <i>Phalacrocorax penicillatus</i> <i>Phalacrocorax verucosus</i> <i>Mergus merganser</i> <i>Mergus serrator</i> <i>Pelecanus erythrorhynchus</i>	Estados Unidos Brasil Uruguai Chile	Vicente <i>et al.</i> (1996) Deardorff & Overstreet (1980) Dronen <i>et al.</i> (2003) Amato <i>et al.</i> (2006)
<i>C. spheniscus</i> Boero & Led, 1970	<i>Spheniscus magellanicus</i> <i>Eudyptes chrysocome</i>	Argentina	Boero <i>et al.</i> (1972) Garbin <i>et al.</i> (2007) Brandão <i>et al.</i> (2014)
<i>C. travassosi</i> Gutierrez, 1943	<i>Phalacrocorax a. albiventer</i> <i>Phalacrocorax brasilianus</i> <i>Pandion haliaetus</i> <i>carolinensis</i>	Argentina Uruguai Estados Unidos	Gutiérrez (1943) Lent & Freitas (1948) Morgan <i>et al.</i> (1949)
<i>C. turgidum</i> Chapin, 1927	<i>Monachus schauislandii</i>	Hawaii	Chapin (1927)
<i>C. variegatum</i> (syn. <i>yamaguti</i>) Rudolphi, 1809	<i>Anous hawajensis</i>	Hawaii	Chapin (1927)

Tabela 2. Dados morfométricos (em mm) de *Contracaecum* n. sp. espécimes machos e fêmeas de *Nannopterum brasilianus* coletados na província de Córdoba, Argentina, em comparação com outros parasitos coletados no mesmo hospedeiro na América do Sul.

Espécies							
	<i>Contracaecum</i> n. sp.	<i>C. jorgei</i> Sardella, Mancini, Salinas, Simões & Luque, 2020	<i>C. rudolphii</i> Hartwich, 1964	<i>C. australe</i> Garbin, Mattiucci, Paoletti, González-Acuña, Giuseppe & Nascetti, 2011	<i>C. travassosi</i> Gutiérrez, 1943	<i>C. multipapillatum</i> von Drasche, 1882	<i>C. caballeroi</i> Bravo Hollis, 1939
Referências	Presente estudo	Sardella <i>et al.</i> , 2020	Amato <i>et al.</i> , 2006	Garbin <i>et al.</i> , 2011	Gutiérrez, 1943	Lucker, 1941	Lent & Freitas, 1948
Hospedeiros	<i>Nannopterum</i> <i>brasilianus</i>	<i>N. brasilianus</i>	<i>N. brasilianus</i> (syn. <i>Ph.</i> <i>brasilianus</i>)	<i>N. brasilianus</i> (syn. <i>Ph.</i> <i>brasilianus</i>)	<i>Ph. albiventer</i> (syn. <i>Ph. atriceps</i>)	<i>Mycteria</i> <i>americana</i>	<i>N. brasilianus</i> (syn. <i>Phalacrocorax</i> <i>vigua</i>)
Outros hospedeiros	-	-	<i>Ph. Carbo</i> <i>Ph. capensis</i> <i>Ph. penicillatus</i> <i>Ph. verucosus</i> <i>Mergus merganser</i> <i>Mergus serrator</i> <i>Pelecanus</i> <i>erythrorhynchus</i>	<i>Ph. gaimardi</i>	<i>Phalacrocorax a.</i> <i>albiventer</i> <i>N. brasilianus</i> (syn. <i>Ph.</i> <i>brasilianus</i>) <i>Pandion haliaetus</i> <i>carolinensis</i>	<i>Ph. brasilianus</i> <i>Ardea herodias</i> <i>Ardea alba</i> <i>Egretta thula</i> <i>Bobulcus ibis</i> <i>Pelecanus</i> <i>erythrorhynchus</i> <i>Pelecanus</i> <i>occidentalis</i> <i>Anhinga anhinga</i> <i>Mugil cephalus</i>	<i>Anhinga anhinga</i>

Localidade	Argentina	Argentina	Estados Unidos Brasil Uruguai Chile	Chile Argentina	Argentina Uruguai Estados Unidos	México Brasil Argentina Porto Rico Estados Unidos Golfo do México	Uruguai México
Macho (n)	5	9	30	10	Sem dados	5	3
Comprimento do corpo	7.69-12.90 (10.99)	14.31-20.98 (15.95)	18-31 (25)	13.90-28.40 (23.24)	16.10-25.40	12.7-25.0 (18.04)	24.29-26.97
Largura máxima do corpo	0.15-0.22 (0.19)	0.29-0.59 (0.38)	0.3-0.5 (0.4)	0.64-0.93 (0.75)	0.70-1.10	0.54-0.83 (0.71)	0.53-0.64
Anel nervoso DAE*	0.28-0.43 (0.35)	0.29-0.46 (0.37)	-	0.58-0.68 (0.63)	0.45-0.64	0.30-0.52 (0.38)	0.43-0.45
Comprimento do esôfago	1.62-2.96 (1.99)	2.01-3.88 (2.62)	2.4-3.8 (3.1)	2.62-4.60 (3.62)	2.80-4.10	2.58-3.84 (3.27)	3.18-3.48
Comprimento do ceco intestinal	0.85-2.41 (1.28)	1.19-3.32 (1.94)	2.1-2.9 (2.4)	1.56-3.24 (2.41)	1.90-3.20	2.02-3.19 (2.64)	2.71-3.01
ICL:BL	7.33-18.67%	8.00-15.83%	-	-	-	-	-
Comprimento do ventrículo	0.07-0.11 (0.09)	0.03-0.09 (0.05)	-	0.2-0.38 (0.28)	-	0.06-0.12 (0.08)	0.09-0.10
Comprimento do apêndice ventricular	0.52-0.59 (0.55)	0.29-0.57 (0.40)	0.8-1.2 (1.0)	0.87-1.41 (1.17)	0.74-1.30	0.43-0.52 (0.47)	0.51-0.61
VAL:BL	4.37-6.88%	1.82-3.41%	-	-	-	-	-
Comprimento dos espículos	R: 0.79-0.88 (0.84) (n=4) L: 0.70-0.75 (0.73) (n=4)	R: 2.28-3.63 (2.81) (n=4) L: 2.03-3.18 (2.61) (n=4)	R: 4.5-7.5 (6.2) L: 5.9-8.2 (7.1)	9.60-15.88 (11.97)	7.70-11.10	0.78-1.9 (1.58)	0.90-1.09
Cauda	0.12-0.16 (0.14)	0.15-0.21 (0.17)	0.1-0.2 (0.2)	0.18-0.24 (0.22)	0.19-0.26	0.10-0.15 (0.13)	0.13-0.15
Pares de papilas pré-cloacais	27-30	26	30	27-32	26-30	60-70	54
Papilas ad-cloacais	-	-	1-2	-	-	3-4	-
Papilas pós-cloacais	8 (sem os fasmídeos)	6 (sem os fasmídeos e a placa mediana)	6 (sem os fasmídeos)	6 (sem os fasmídeos e a placa mediana)	-	11	7
Pares de papilas duplas	-	-	-	-	-	1	-
Pares de papilas paracloacais	3	1	2	-	-	-	-
Pares de papilas subventrais	2	3	2	4	-	5	-

Pares de papilas sublaterais	3	2	2	2	-	4	-
Placa mediana ou papilas medianas	-	1	-	1	-	-	-
Pares de fasmídeos	1	1	1	1	-	1	-
Fêmea (n)	5	6	30	10	Sem dados	2	-
Comprimento do corpo (mm)	6.17-9.44 (7.81)	15.25-18.77 (16.64)	23-52 (41.8)	25.44-41.23 (31.60)	22.7-31.5	35.0-35.0 (35.0)	-
Largura máxima do corpo (mm)	0.14-0.18 (0.16)	0.32-0.50 (0.40)	0.5-1.1 (0.8)	0.66-1.16 (0.94)	1.10-1.50	1.0-1.09 (1.04)	-
Anel nervoso DAE* (mm)	0.28-0.32 (0.30)	0.30-0.39 (0.36)	-	0.50-0.68 (0.58)	0.59-0.73	0.37-0.46 (0.41)	-
Comprimento do esôfago (mm)	1.27-1.63 (1.50)	2.50-3.81 (2.96)	2.4-5.4 (4.2)	1.52-3.95 (3.24)	3.50-4.80	4.76-4.98 (4.87)	-
Comprimento do ceco intestinal (mm)	0.89-1.14 (1.00)	1.60-2.10 (1.90)	1.6-3.6 (2.9)	1.30-2.86 (2.13)	2.70-4.20	4.12-4.19 (4.15)	-
ICL:BL	11.18-14.45%	10.53-11.18%	-	-	-	-	-
Comprimento do ventrículo (mm)	0.08-0.11 (0.10)	0.02-0.07 (0.04)	-	0.14-0.28 (0.25)	0.89-1.60	0.14-0.14 (0.14)	-
Comprimen (mm)	0.47-0.58 (0.53)	0.40-0.61 (0.49)	0.6-1.5 (1.2)	0.57-0.91 (0.70)	-	0.65-0.70 (0.67)	-
VAL:BL	6.15-8.13%	2.63-3.26%	-	-	-	-	-
Vulva DAE* (mm)	3.51-4.48 (4.83)	6.57-8.48 (7.86)	9.7-21.3 (15.2)	8.25-10.87 (9.26)	18.60-21.00	11.71-12.65 (12.18)	-
VL:BL	48.31-63.35%	43.11-45.17%	29.7-46.5%	-	-	-	-
Cauda (mm)	0.13-0.18 (0.16)	0.17-0.25 (0.22)	0.2-0.6 (0.4)	0.28-0.58 (0.39)	0.43-0.54	0.22-0.22 (0.22)	-

* DAE, distância da extremidade anterior

VAL:BL = Razão entre o comprimento do apêndice ventricular em relação ao comprimento do corpo

ICL:BL = Razão entre o comprimento do ceco intestinal em relação ao comprimento do corpo

VL:BL = Razão entre o comprimento da vulva até a extremidade anterior em relação ao comprimento do corpo

Tabela 3. Dados morfométricos (em mm) de larvas de quarto estágio de *Contracaecum* n. sp. de *Nannopterum brasilianus* do presente estudo em comparação com outras larvas descritas.

	Espécies			
	<i>Contracaecum</i> n. sp.	<i>Contracaecum</i> sp. Garbin, Navone, Diaz & Cremonte, 2007	<i>Contracaecum</i> sp. Kanarek & Bohdanowicz, 2009	<i>C. jorgei</i> Sardella, Mancini, Salinas, Simões & Luque, 2020
Referências	Presente estudo	Garbin et al., 2007	Kanarek & Bohdanowicz, 2009	Sardella <i>et al.</i> , 2020
Hospedeiro	<i>Nannopterum brasilianus</i>	<i>S. magellanicus</i>	<i>Ph. carbo</i>	<i>N. brasilianus</i>
Comprimento do corpo	4.49-5.61 (5.08)	3.77-6.68 (5.23)	4.21-9.20 (7.16)	14.01-16.67 (15.17)
Máxima largura do copro	0.09-0.21 (0.12)	0.12-0.27 (0.20)	0.14-0.26 (0.22)	0.21-0.52 (0.30)
Anel nervoso DAE*	0.19-0.24 (0.21)	0.17-0.28 (0.24)	0.20-0.29 (0.25)	0.28-0.42 (0.32)
Comprimento do esôfago	0.72-1.06 (0.92)	0.76-1.38 (1.08)	0.71-1.17 (0.96)	1.99-2.91 (2.24)
Comprimento do ceco intestinal	0.42-0.65 (0.57)	0.50-0.94 (0.74)	0.42-1.03 (0.90)	1.31-2.26 (1.56)
ICL:BL	9.38-11.85%	-	-	9.35–13.57%
Comprimento do ventrículo	0.04-0.07 (0.05)	-	-	0.05-0.10 (0.08)
Comprimento do apêndice ventricular	0.33-0.45 (0.39)	0.22-0.43 (0.34)	0.36-0.82 (0.61)	0.31-0.50 (0.42)
VAL:BL	6.49-9.20%	-	-	2.27– 2.99%
Comprimento da Cauda	0.13-0.15 (0.14)	0.10-0.16 (0.13)	0.09-0.14 (0.12)	0.10-0.18 (0.14)

* DAE, distância da extremidade anterior.

VAL:BL = Razão entre o comprimento do apêndice ventricular em relação ao comprimento do corpo

ICL:BL = Razão entre o comprimento do ceco intestinal em relação ao comprimento do corpo

5. CONCLUSÕES GERAIS

- As duas espécies novas encontradas mostram que o conhecimento tanto de adultos quanto de larvas de espécies de *Contracaecum* da Argentina ainda é muito limitado, dada a abundância dessas espécies na região;
- Existem muitos trabalhos ecológicos, mas poucos trabalhos de taxonomia integrativa, não permitindo que aconteça o registro de algumas espécies na Argentina.
- Novas descobertas fornecem dados para estudos futuros destes parasitos, que podem estar presentes em peixes marinhos ao longo de toda a costa, destinados ao consumo humano, facilitando novas pesquisas e alertando sobre as possibilidades de contaminação por anisakiase, o que mostra a importância da realização deste tipo de estudo.
- O conhecimento de larvas de anisquídeos para a Argentina ainda é muito limitado quando falamos de análises moleculares. Esta técnica se mostra muito importante, principalmente quando falamos sobre larvas de terceiro estágio que não apresentam características de diferenciação entre espécies ou quando queremos elucidar o ciclo biológico de algumas espécies;
- As observações geradas pela análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) se mostram essenciais pois nos permitem acrescentar detalhes à descrição de algumas espécies e especificar com precisão a posição de algumas estruturas superficiais como deirídios e papilas, bem como a topografia cuticular. Infelizmente existe uma dificuldade grande, tanto financeira quanto institucional para realização de algumas análises, o que dificulta a obtenção de melhores resultados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOLLO, E.; GESTAL, C.; PASCUAL, S. Anisakid infection in the European shag *Phalacrocorax aristotelis*. **Journal of Helminthology**, v. 75, p. 209–214, 2001.
- AMATO, J. F. R.; MONTEIRO, C. M.; AMATO, S. B. *Contracaecum rudolphii* Hartwich (Nematoda, Anisakidae) from the neotropical cormorant, *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Aves, Phalacrocoracidae) in southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p. 1284–1289, 2006.
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission**, 2nd ed. CABI Publishing, New York, New York, p. 650, 2000.
- ANDERSON, R. C.; CHABAUD, A. G.; WILLMOTT, S. **Nematode Parasites of Vertebrates 2 Edition: Their development and transmission**. CAB Publishing, London. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Archival Volume. CAB International, Wallingford (UK), p. 463, 2009.
- BARUŠ, V. **Nemátodos parásitos de aves em Cuba**. Parte I. Poeyana Serie A, v. 22, p. 1-37, 1966.
- BILLINGS, A. N.; YU, X.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 474–478, 1998.
- BIOLÉ, F. G.; GUAGLIARDO, S. E.; MANCINI, M. A.; TANZOLA, R. D.; SALINAS, V.; MORRA, G. Primer registro de *Contracaecum australe* (Nematoda: Anisakidae) em *Phalacrocorax brasilianus* (Aves: Phalacrocoracidae) de la región central de Argentina. **BioScriba**, v. 5, p. 1–11, 2012.
- BOERO, J. J.; LED, J. E.; BRANDETTI, E. El parasitismo de la fauna autóctona. **Revista de Agronomía y Veterinaria**, v. 1, p. 17-29, 1970.
- BOERO, J. J.; LED, J. E.; BRANDETTI, E. Algunos parasitos de la avifauna Argentina. **Analecta Veterinaria**, v. 4, n. 1, p. 17–32, 1972.
- BORGES, J. N.; SANTOS, H. L. C.; BRANDÃO, M. L.; SANTOS, E. G.; MIRANDA, D. F.; BALTHAZAR, D.; LUQUE, J. L.; SANTOS, C. P. Molecular and morphological characterization of *Contracaecum pelagicum* (Nematoda) parasitizing *Spheniscus magellanicus* (Chordata) from Brazilian Waters. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 74-79, 2014.
- BRANDÃO, M. L.; MOREIRA, J.; LUQUE, J. L. Checklist of Platyhelminthes, Acanthocephala, Nematoda and Arthropoda parasitizing penguins of the world. **Check List**, v. 10, n. 3, p. 562–573, 2014.

- BRAVO HOLLIS, M. *Contracaecum caballeroi* n. sp. (Nematoda: Heterocheilidae) parásito de *Anhinga anhinga*. **Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México**, v. 10, n. 3-4, p. 293-296, 1939.
- CABALLERO, C. E.; PEREGRINA, D. I. Contribución al conocimiento de los nematodos de las aves de México. **VII Anales del Instituto de Biología**, v. 9, n. 1-2, p. 151-163, 1938.
- CAMPOS, S. D. E.; PEREIRA, B. B. N.; SICILIANO, S.; COSTA, C. H. C.; ALMOSNY, N.R.P.; BRENER, B. *Contracaecum pelagicum* and *C. plagiaticium* (Nematoda: Anisakidae) infection in *Magellanic penguins* (Sphenisciformes: Spheniscidae) on the coast of Rio de Janeiro State. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 89-93, 2013.
- CEBALLOS-MENDIOLA, G.; VALERO, A.; POLO-VICO, R.; TEJADA, M.; ABATTOUY, N.; KARL, H.; DE LAS HERAS, C.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J. Genetic variability of *Anisakis simplex* parasitizing European hake (*Merluccius merluccius*) in the Little Sole Bank area in the Northeast Atlantic. **Parasitology Research**, v. 107, p. 1399-1404, 2010.
- CHAPIN, E. A. Descriptions of new internal parasites. **Proceedings of the U.S. National Museum**, v. 68, n. 2, p. 1-4, 1927.
- D'AMELIO, S.; CAVALLERO, S.; DRONEN, N. O.; BARROS, N. B.; PAGGI, L. Two new species of *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 (Nematoda: Anisakidae), *C. fagerholmi* n. sp. and *C. rudolphii* F from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* in the northern Gulf of Mexico. **Systematic Parasitology**, v. 81, p. 1-16, 2012.
- DEARDORFF, T. L.; OVERSTREET, R. M. *Contracaecum multipapillatum* (= *C. robustum*) from fishes and birds in the northern Gulf of Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 66, p. 853-856, 1980.
- DIAZ, J.; CREMONTE, F.; NAVONE, G. T. Helminths of the Magellanic penguin, *Spheniscus magellanicus* (Sphenisciformes), during the breeding season in Patagonian Coast, Chubut, Argentina. **Comparative Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 172-177, 2010.
- DICK, T. A.; PAPST, M. H.; PAUL, H. C. Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) stocking and *Contracaecum* spp. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, p. 242-247, 1987.
- DORNY, P.; PRAET, N.; DECKERS, N.; GABRIEL, S. Emerging food-borne parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 196-206, 2009.
- DRONEN, N. O.; BLEND, C. K.; ANDERSON, C. K. Endohelminths from the Brown Pelican, *Pelecanus occidentalis*, and the American White Pelican, *Pelecanus erythrorhynchus*, from Galveston Bay, Texas, U.S.A., and Checklist of Pelican Parasites. **Comparative Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 140-154. 2003.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC evolutionary biology**, v. 7, p. 214, 2007.
- DYER, W. G.; WILLIAMS JR., E. H.; MIGNUCCIGIANNONI, A. A.; JIMENEZ MARRERO, N. M.; BUNKLEYWILLIAMS, L.; MOORE, D. P.; PENCE, D. B. Helminth and

arthropod parasites of the brown pelican, *Pelecanus occidentalis*, in Puerto Rico, with a compilation of all metazoan parasites reported from this host in the Western Hemisphere. **Avian Pathology**, v. 31, p. 441-448, 2002.

DZIEKOŃSKA-RYNKO, J.; ROKICKI, J. Life cycle of the nematode *Contracaecum rudolphii* Hartwig, 1964 (sensu lato) from northern Poland under laboratory conditions. **Helminthologia**, v. 44, p. 95–102, 2007.

FAGERHOLM, H. P.; GIBSON, D. I. A redescription of the pinniped parasite *Contracaecum ogmorhini* (Nematoda, Ascaroidea), with an assessment of its antiboreal circumpolar distribution. **Zoologica Scripta**, v. 16, p. 19-24, 1987.

FAGERHOLM, H. P.; OVERSTREET, R. M.; HUMPREY-SMITH, I. *Contracaecum magnipapillatum* (Nematoda; Ascaridoidea): resurrection and pathogenic effect of a common parasite from the proventriculus from *Anous minutus* from the Great Barrier Reef, with a note of *C. variegatum*. **Helminthologia**, v. 33, p. 195–207, 1996.

FEDYNICH, A. M.; PENCE, D. B.; BERGAN, J. F. Helminth community structure and pattern in sympatric populations of Double-crested and Neotropic cormorants. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v. 64, p. 176–182, 1997.

FFLORES-BARROETA, L. Nematodos de aves y mamíferos. **Revista Ibérica de Parasitología**, v. 17, p. 277–297, 1957.

GALEANO, N. A.; TANZOLA, R. D. *Contracaecum ovale* (Nematoda: Anisakidae) from Rollandia rolland Quoy & Gaimard 1824 (Aves, Podicipedidae) in Argentina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 143-147, 2012.

GARBIN, L. E.; NAVONE, G. T.; DIAZ, J. I.; CREMONTE, F. Further study of *Contracaecum pelagicum* (Nematoda: Anisakidae) in *Spheniscus magellanicus* (Aves: Spheniscidae) from Argentinean coasts. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 143–150, 2007.

GARBIN, L. E.; DIAZ, J. I.; CREMONTE, F.; NAVONE, G. T. A new anisakid species parasitizing the Imperial Cormorant *Phalacrocorax atriceps* from the north Patagonian coast, Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 852–859, 2008.

GARBIN, L.; MATTIUCCI, S.; PAOLETTI, M.; GONZÁLEZ-ACUNÁ, D.; NASCETTI, G. Genetic and morphological evidences for the existence of a new species of *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) parasite of *Phalacrocorax brasilianus* (gmelin) from Chile and its genetic relationships with congeners from fish-eating birds. **Journal of Parasitology**, v. 97, p. 476–492, 2011.

GARBIN, L. E.; MATTIUCCI, S.; PAOLETTI, M.; DIAZ, J. L.; NASCETTI, G.; NAVONE, G. T. Molecular identification and larval morphological description of *Contracaecum pelagicum* (Nematoda: Anisakidae) from the anchovy *Engraulis anchoita* (Engraulidae) and fish-eating birds from the Argentine North Patagonian Sea. **Parasitology International**, v. 62, p. 309–319, 2013.

GARBIN, L.; CAPASSO, S.; DIAZ, J.; MORGENTHALER, A.; MILLONES, A. Nuevo hospedador y registro geográfico de *Contracaecum australe* (Nematoda, Anisakidae) parasitando a *Phalacrocorax gaimardi* (Aves, Phalacrocoracidae) en costas del Atlántico Sudoccidental. **Revista Argentina de Parasitología**, v. 2, n. 3, p. 6-11, 2014.

GARBIN, L. E.; DIAZ, J. I.; NAVONE, G. T. Species of *Contracaecum* parasitizing the Magellanic penguin *Spheniscus Magellanicus* (Spheniscidae) from the Argentinean coast. **Journal of Parasitology**, v. 105, p. 222–231, 2019.

GUTIÉRREZ, R. O. Sobre la morfología de una nueva especie de *Contracaecum* (Nematoda: Ascaridoidea). **Revista Brasileira de Biología**, v. 3, p. 159-172, 1943.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAMMOND, P. M. **Species inventory**. Global Diversity: Status of the Earth's Living Resources, edited by B Groombridge. London: Chapman & Hall, p. 17-39, 1992.

HARRISON, P. **Seabirds, an identification guide**. Houghton Mifflin, Boston, Massachusetts, p. 448, 1985.

HARTWICH, G. Die Typen Parasitischer Nematoden in der Helminthen-Sammlung des Zoologischen Museums in Berlin. I. Ascaridoidea. **Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin**, v. 40, p. 1-53, 1964.

HUELSENBECK, J.; RONQUIST, F. **Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes**. In R Nielsen (Ed.) Statistical methods in molecular evolution. London, UK, Springer, p. 183–226, 2005.

HUIZINGA, H. The life cycle of *Contracaecum multipapillatum* (Von Drasche, 1882) Lucker, 1941 (Nematoda: Heterocheilidae). **Journal of Parasitology**, v. 53, p. 368–375, 1967.

HUGOT, J. P.; BAUJA RD, P.; MORAND, S. Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. **Nematology**, v. 3, n. 1, p. 199–208, 2001.

JEX, A. R.; WAESCHENBACH, A.; LITTLEWOOD, D. T. J.; HU, M.; GASSER, R. B. The mitochondrial Genome of *Toxocara canis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. 273, 2008.

KALMBACH, E.; BECKER, P. H. Growth and survival of neotropic cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*) chicks in relation to hatching order and brood size. **Journal of Ornithology**, v. 146, p. 91-98, 2005.

KANAREK, G.; BOHDANOWICZ, J. Larval *Contracaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in the Great Cormorant [*Phalacrocorax carbo* (L., 1758)] from north-eastern Poland: a morphological and morphometric analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 90–97, 2009.

KENNEDY, M.; SPENCER, H. G. Classification of the cormorants of the world. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 79, p. 249–257, 2014.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111–120, 1980.

KINSELLA, J. M.; SPALDING, M. G.; DONALD, J. Forrester "Parasitic Helminths of the American White Pelican, *Pelecanus erythrorhynchos*, from Florida, U.S.A". **Comparative Parasitology**, v. 71, n. 1, p. 29-36, 2004.

KØIE, M.; FAGERHOLM, H. P. The life cycle of *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802) sensu stricto (Nematoda, Asc, aridoidea, Anisakidae) in view of experimental infections. **Parasitology Research**, v. 81, p. 481–489, 1995.

KREIS, H. A. *Contracaecum septentrionale*, ein neuer Parasit aus dem Kormoran; sein Lebenslauf, sowie Angaben über die Entwicklung der Anisakinae. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 17, p. 106–121, 1995.

KUIKEN, T.; LEIGHTON, F.; WOBESER, G.; WAGIVER, B. Causes of morbidity and mortality and their effect on reproductive success in double-crested cormorants from Saskatchewan. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, p. 332–346, 1999.

LABRIOLA, J.; SURIANO, D. M. Parasitic nematodes of birds from De Monte Pond, Buenos Aires, Argentina. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 51, p. 59-65, 1996.

LEFEVRE, T.; LEBARBENCHON, C.; GAUTHIER-CLERC, M.; MISSE, D.; POULIN, R.; THOMAS, F. The ecological significance of manipulative parasites. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 24, n. 1, p. 41-48, 2009.

LENT, H.; FREITAS, J. F. T. Uma coleção de nematódeos parasitos de vertebrados do Museu de Historia Natural de Montevideo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 46, p. 1–71, 1948.

LUCKER, J. T. A redescription of *Contracaecum multipapillatum* (von Drasche, 1882) (Nematoda: Anisakinae). **Journal of Parasitology**, v. 27, p. 505–512, 1941a.

LUCKER, J. *Contracaecum quincuspis*, a new species of nematode from the American waterturkey. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, v. 31, p. 33-37, 1941b.

LUQUE, J. L.; AGUIAR, J.; VIEIRA, F.; GIBSON, D.; SANTOS, C. Checklist of Nematoda associated with the fishes of Brazil. **Zootaxa**, v. 3082, p. 1–88, 2011.

MANCINI, M. A.; GROSMAN, F. **El pejerrey de las lagunas pampeanas. Análisis de casos tendientes a una gestión integral de las pesquerías**. Ed Universidad Nacional de Río Cuarto – Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, p. 449. 2008.

MANCINI, M. A.; BIOLÉ, F. G.; SALINAS, V. H.; GUAGLIARDO, S. E.; TANZOLA, R. D.; MORRA, G. Prevalence, intensity and ecological aspects of *Contracaecum* sp. (Nematode: Anisakidae) in freshwater fish of Argentina. **Neotropical Helminthology**, v. 8, p. 111–122, 2014.

MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; FENERICK, J. J. R. Larval *Contracaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Osteichthyes: Erythrinidae) of economic importance in occidental marshlands of Maranhão, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 51-59, 2005.

MATTIUCCI S., CIANCHI, R.; NASCETTI, G.; PAGGI, L.; SARDELLA, N.; TIMI, J.; WEBB, S. C.; BASTIDA, R.; RODRIGUEZ, D.; BULLINI, L. Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston and Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. **Systematic Parasitology**, v. 54, p. 15-23, 2003.

MATTIUCCI, S., M. PAOLETTI, J. OLIVERO-VERBEL, R. BALDIRIS, B. ARROYOSALGADO, L. GARBIN, G. NAVONE & G. NASCETTI. *Contracaecum bioccai* n. sp. From the brown pelican *Pelecanus occidentalis* (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): Morphology, molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds. **Systematic Parasitology**, v. 69, p. 101–121, 2008a.

MATTIUCCI, S.; NASCETTI, G. Advances and trends in the molecular systematics of Anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. **Advances in Parasitology**, v. 66, p. 47–148, 2008.

MATTIUCCI, S.; PAOLETTI, M.; SOLORZANO, A. C.; NASCETTI, G. *Contracaecum gibsoni* n. sp. and *C. overstreeti* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from the Dalmatian pelican *Pelecanus crispus* (L.) in Greek waters: genetic and morphological evidence. **Systematic Parasitology**, v. 75, p. 207–224, 2010.

MATTIUCCI, S.; CIPRIANI, P.; WEBB, S. C.; PAOLETTI, M.; MARCER, F.; BELLISARIO, B.; GIBSON, D. I.; NASCETTI, G. Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). **Journal of Parasitology**, v. 100, p. 199-214, 2014.

MCCLELLAND, G.; RONALD, K. In vitro development of the nematode *Contracaecum osculatum* Rudolphi, 1802 (Nematoda: Anisakinae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 52, p. 847–855, 1973.

MCDANIEL, B. & PATTERSON, I. Nematode infestation of a white pelican found along the gulf coast of Texas. **Southwestern Naturalist**, v. 11, n. 312, 1966.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, p. 45-52, 2010.

MORAVEC, F.; KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M. Nematode parasites of fishes of the Paraná River, Brazil. Part 2. Seuratoidea, Ascaridoidea Habronematoidea and Acuarioidea. **Folia Parasitologica**, v. 40, p. 115–134, 1993.

MORAVEC, F. **Nematodes of Freshwater Fishes of the Neotropical Region**. p. 464. Prague, Czech Republic, Academia Praha, 1998.

- MORAVEC, F. Experimental studies on the development of *Contracaecum rudolphii* (Nematoda: Anisakidae) in copepod and fish paratenic hosts. **Folia Parasitologica**, v. 56, p. 185–193, 2009.
- MORGAN, B. B.; SCHILLER, E.; RAUSCH, R. The occurrence of *Contracaecum travassosi* (Nematoda) in North America. **Journal of Parasitology**, v. 35, p. 541–542, 1949.
- MORRISON, M. L.; SHANLEY, J. R.; SLACK, R. D. Breeding biology and age-specific mortality of olivaceous cormorants. **Southwestern Naturalist**, v. 24, p. 259–266, 1979.
- NADLER, S. A.; HUDSPETH, D. S. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on tree genes and morphology: Hypotheses of structural and sequence evolution. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 380–393, 2000.
- NAGASAWA, K.; BARUS, V.; OGI, H. Descriptions of Larval *Contracaecum variegatum* (Rudolphi, 1809) and Adult *Contracaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) Collected from Seabirds of the Bering Sea. **J. Yamashina Institute for Ornithology**, v. 30, p. 22–30, 1998.
- NAGASAWA, K. The biology of *Contracaecum osculatum* sensu lato and *C. osculatum* A (Nematoda: Anisakidae) in Japanese waters: a review. **Biosphere Science**, v. 51, p. 61–69, 2012.
- NAVONE, G. T.; ETCHEGOIN, J. A.; CREMONTE, F. *Contracaecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakidae) from *Egretta alba* (Aves: Ardeidae) and comments on other species of this genus in Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 807–810, 2000.
- PEKMEZCI, G. Z.; YARDIMCI, B. On the occurrence and molecular identification of *Contracaecum* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Mugil cephalus* from Turkish waters. **Parasitology Research**, v. 118, p. 1393–1402, 2019.
- PINHEIRO, R. H. S.; FURTADO, A. O.; SANTOS, J. N.; GIESE, E. G. *Contracaecum* larvae: morphological and morphometric retrospective analysis, biogeography and zoonotic risk in the amazon. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 28, p. 12–32, 2019.
- PORTES-SANTOS, C. P. Um nematodeo parasito de pinguim *Spheniscus magellanicus* (Forster) (Ascaridoidea: Anisakidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 233–237, 1984.
- POULIN, R.; MORAND, S. The Diversity of Parasites. **The Quarterly Review of Biology**, v. 75, n. 3, p. 277–293, 2000.
- POULIN, R. Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. **International Journal of Parasitology**, v. 44, n. 9, p. 581–589, 2014.
- SARDELLA, C. J.; MANCINI, M.; SALINAS, V.; SIMÕES, R. O.; LUQUE, J. L. A new species of *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) found parasitizing *Nannopterum brasilianus* (Suliformes: Phalacrocoracidae) and *Hoplias argentinensis* (Characiformes: Erythrinidae) in

South America: morphological and molecular characterization of larval and adult stages. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. 1–11, 2020.

SCHUURMANS STEKHOVEN, J. H. Nematodos parasitarios del Chaco Paraguayo y de Argentina. **Acta Zoológica Lilloana**, v. 9, p. 325-345, 1950.

SCHUURMANS STEKHOVEN, J. H. Nematodos parasitarios de anfibios, pájaros y mamíferos de la República Argentina. **Acta Zoológica Lilloana**, v. 10, p. 315–400, 1937.

SEMENOVA, M. K. The development of *Contracaecum microcephalum* (Anisakidae) in the definitive host. **Trudy Gel'mintologicheskoi Laboratorii**, v. 24, p. 153–60, 1974.

SILVA, R. J., T. F. RASO, P. J. FARIA & F. P. CAMPOS. Occurrence of *Contracaecum pelagicum* Johnston & Mawson 1942 (Nematoda, Anisakidae) in *Sula leucogaster* Boddaert 1783 (Pelecaniformes, Sulidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 565-567, 2005.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

TIMI, J. T., SARDELLA, N. H.; MATTIUCCI, S. *Contracaecum ogmorhini* s. s. Johnston et Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae), parasite of *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) off the Argentinean coast. **Helminthologia**, v. 40, p. 25-31, 2003.

TORRES, P. R.; VALDIVIESO, J.; SCHLATTER, R.; MONTEFUSCO, A.; REVENGA, J.; MARÍN, F.; LAMILLA, J.; RAMALLO, G. Infection by *Contracaecum rudolphii* (Nematoda: Anisakidae) in the Neotropic cormorant *Phalacrocorax brasilianus*, and fishes from the estuary of the Valdivia river. Chile. **Studies on Neotropic Fauna and Environment**, v. 35, p. 101–108, 2000.

VICENTE, J. J.; MAGALHAES PINTO, R.; NORONHA, D.; CARVALHO, P. G. Nematode parasites of Brazilian Pelecaniformes and Trogoniformes birds: a general survey with new records for the species. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 13, n. 4, p. 891 - 901, 1996.

VIDAL-MARTÍNEZ, V. M.; OSORIO-SARABIA, D.; OVERSTREET, R. M. Experimental infection of *Contracaecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakinae) from Mexico in the domestic cat. **Journal of Parasitology**, v. 80, p. 576–579, 1994.

VIOLANTE-GONZÁLEZ, J.; MONKS, S.; GIL-GUERRERO, S.; ROJAS-HERRERA, A.; FLORES-GARZA, R.; LARUMBE-MORÁN, E. Parasite communities of the neotropical cormorant *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Aves, Phalacrocoracidae) from two coastal lagoons in Guerrero state, Mexico. **Parasitology Research**, v. 109, p. 1303–1309, 2011.

WALTON, A. C. Some new and little known nematodes. **Journal of Parasitology**, v. 10, p. 60-73, 1923.

YAMAGUTI, S. **The Nematodes of Vertebrates**. Part I. Interscience Publishers Incorporated, New York, New York. Systema Helminthum. vol. III, p. 679, 1961.

ZHU, X. Q.; GASSER, R. B.; PODOLSKA, M.; CHILTON, N. B. Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1911–1921, 1998.

7. ANEXO

Journal of Helminthology

cambridge.org/jhl

Research Paper

Cite this article: Sardella CJ, Mancini M, Salinas V, Simões RO, Luque JL (2020). A new species of *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) found parasitizing *Nannopterum brasilianus* (Suliformes: Phalacrocoracidae) and *Hoplias argentinensis* (Characiformes: Erythrinidae) in South America: morphological and molecular characterization of larval and adult stages. *Journal of Helminthology* 94, e194, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0022149X20000644>

Received: 3 May 2020
Revised: 16 July 2020
Accepted: 22 July 2020

Key words:

Fourth-stage larvae; mitochondrial cytochrome oxidase II; parasites; scanning electron microscopy; third-stage larvae

Author for correspondence:

J.L. Luque, E-mail: luquedmj@gmail.com

A new species of *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) found parasitizing *Nannopterum brasilianus* (Suliformes: Phalacrocoracidae) and *Hoplias argentinensis* (Characiformes: Erythrinidae) in South America: morphological and molecular characterization of larval and adult stages

C.J. Sardella¹, M. Mancini², V. Salinas², R.O. Simões³ and J.L. Luque² 

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, km 7, 23090-000 Seropédica, RJ, Brazil; ²Ecología y Acuicultura, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina and ³Departamento de Parasitología Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23851-970 Seropédica, RJ, Brazil

Abstract

Nematode species of the genus *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 have been reported around the world in many species of fish-eating birds and seals. Here, *Contracaecum jorgei* n. sp. is morphologically described using light and scanning electron microscopy for adults and fourth-stage larvae (L4) found in the bird *Nannopterum brasilianus* and third-stage larvae (L3) found in the freshwater fish *Hoplias argentinensis*, both from the province of Córdoba, Argentina. Additionally, sequences of cytochrome *c* oxidase subunit II were obtained from these specimens and molecular phylogenetic analysis was used to determine its relationships within the genus. The present species is distinguished from other species by the number and disposition of cephalic papillae, shape and size of the interlabia; length of the spicules; and number and arrangement of papillae in the posterior end of the male. Furthermore, in the molecular analyses, sequences obtained from adult L4 and L3 specimens of *C. jorgei* n. sp. were similar and grouped, forming an independent lineage, thus confirming it as a distinct species. Thus, morphological characteristics associated with molecular data support the proposal of a new species.

Introduction

Several species of the genus *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 have been reported around the world in many species of fish-eating birds, including those belonging to the family Phalacrocoracidae (Abollo *et al.*, 2001). Their life cycle is heteroxenous, involving piscivorous birds or pinnipeds (definitive hosts), small crustaceans (first intermediate host) and fish (intermediate hosts). Birds are infected by eating fish containing third-stage larvae (L3), and the fish acquire them by ingesting other fish and/or crustaceans containing second-stage larvae or L3 (Anderson, 2000). Adults are found parasitizing the intestine and proventriculus of the definitive host, where they often cause pathological lesions (Garbin *et al.*, 2011; Violante-González *et al.*, 2011).

The Neotropical cormorant *Nannopterum brasilianus* (Gmelin, 1789) (syn. *Phalacrocorax brasilianus*) (Suliformes: Phalacrocoracidae) occurs from Patagonia to the coast of Texas (Fedynich *et al.*, 1997; Amato *et al.*, 2006; Conde-Tinco & Iannaccone, 2013; Kennedy & Spencer, 2014). This bird inhabits freshwater and marine environments and is the only one within the family found throughout the Neotropical region (Kalmbach & Becker, 2005).

Five species of *Contracaecum* have been reported parasitizing *N. brasilianus*: *Contracaecum rudolphii* Hartwich, 1964 (syn. *C. spiculigerum*) in Brazil, Chile, Cuba and USA (Barak, 1966; Fedynich *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2000; Amato *et al.*, 2006); *Contracaecum multipapillatum* Drasche, 1882 in Mexico (Vidal-Martínez *et al.*, 1994; Violante-González *et al.*, 2011); *Contracaecum australe* Garbin, Mattiucci, Paoletti, González-Acuña and Nascetti, 2011 in Chile and Argentina (Garbin *et al.*, 2011; Biolé *et al.*, 2012); *Contracaecum travassosi* Gutiérrez, 1943 in Uruguay (Lent & Freitas, 1948); and *Contracaecum caballeroi* Bravo-Hollis, 1939 in Uruguay (Lent & Freitas, 1948).

In this study, we describe a new species of *Contracaecum* using light and scanning electron microscopy (SEM) for adults and fourth-stage larvae (L4) found in *N. brasilianus* and L3 found in the freshwater fish *Hoplias argentinensis* Rosso, Mabragaña, González-Castro,

© The Author(s), 2020. Published by Cambridge University Press

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS