

## ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

## AN ALTERNATIVE TECHNIQUE FOR PREPARING MONOGENEANS

UMA TÉCNICA ALTERNATIVA PARA A PREPARAÇÃO  
DE MONOGENÉTICOSUNA TÉCNICA ALTERNATIVA PARA LA PREPARACIÓN  
DE MONOGENEOSMoisés Gallas<sup>1</sup>\* & Eliane Fraga da Silveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Zoologia dos Invertebrados, Museu de Ciências Naturais, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 92425-900, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* Corresponding author: mgallas88@gmail.com

Moisés Gallas: <https://orcid.org/0000-0003-4525-009X>

Eliane Fraga da Silveira: <https://orcid.org/0000-0002-0992-5136>

**ABSTRACT**

Monogeneans encompass a group of parasites whose identification requires the visualization of both internal and external morphology. In most cases, the techniques involve many steps and the use of restricted substances, in addition to the necessity of protective equipment. Faure's mounting medium, an aqueous medium similar to Hoyer's mounting medium, has already been used for the preparation of the group. This study aimed to evaluate the effectiveness of Faure's medium for the mounting of stained specimens. For this purpose, specimens of *Microcotyle pomatomi* Goto, 1900 and *Gotocotyla acanthura* (Parona & Perugia, 1896) Meserve, 1938, collected from *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766) in the southernmost part of Brazil were used. The monogeneans were stained with five different dyes and mounted between a slide and coverslip using Faure's mounting medium. The specimens that exhibited the best results were stained with Gomori's trichrome and Semichon's acetic carmine. Monogeneans stained with eosin and fast green showed less satisfactory results, primarily because they did not highlight the structures of the reproductive systems. The analysis after years of preparation revealed that the characteristics and conditions of the staining and preparations remained in good condition, ensuring durability. The technique presented establishes a quick and effective method and provides an alternative for mounting monogeneans, especially when dealing with large infrapopulations.

**Keywords:** Faure's medium – Gomori's trichrome – method – mounting – Semichon's acetic carmine – staining

Este artículo es publicado por la revista Neotropical Helminthology de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú auspiciado por la Asociación Peruana de Helmintología e Invertebrados Afines (APHIA). Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.



DOI: <https://dx.doi.org/10.62429/rnh20242181822>

## RESUMO

Monogenéticos compreendem um grupo de parasitos cuja identificação necessita a visualização da morfologia interna e externa. Na maioria dos casos, as técnicas requerem muitas etapas e a utilização de substâncias de uso restrito, além da necessidade de equipamentos para proteção. O meio de montagem de Faure, um meio aquoso similar ao meio de montagem de Hoyer, já foi utilizado para a preparação do grupo. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do meio de Faure na montagem de monogenéticos corados. Foram utilizados espécimes de *Microcotyle pomatomi* Goto, 1900 e *Gotocotyla acanthura* (Parona & Perugia, 1896) Meserve, 1938, coletados de *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766) no extremo sul do Brasil. Os monogenéticos foram corados com cinco corantes e montados entre lâmina e lamínula com o meio de montagem de Faure. Os melhores resultados foram obtidos com os espécimes corados com tricrômico de Gomori e carmim acético de Semichon. Monogenéticos corados com eosina e *fast green* apresentaram resultados menos satisfatórios, principalmente por não evidenciarem as estruturas dos sistemas reprodutores. A análise realizada após anos da preparação evidenciou que as características e condições das colorações e preparações permaneceram em bom estado, garantindo a durabilidade. A técnica apresentada é um método rápido e eficaz, e constitui uma alternativa para a montagem de monogenéticos, principalmente quando são encontradas infrapopulações numerosas.

**Palavras-chave:** carmim acético de Semichon – coloração – meio de Faure – método – montagem – tricrômico de Gomori

## RESUMEN

Los monogeneos son un grupo de parásitos cuya identificación depende de la visualización de su morfología interna y externa. En la mayoría de los casos, las técnicas requieren múltiples pasos y el uso de sustancias restringidas, además de la necesidad de equipos de protección. El medio de montaje de Faure, un medio acuoso similar al medio de montaje de Hoyer, ya se ha utilizado para la preparación de estos parásitos. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia del medio de Faure en el montaje de monogeneos coloreados. Se utilizaron especímenes de *Microcotyle pomatomi* Goto, 1900 y *Gotocotyla acanthura* (Parona & Perugia, 1896) Meserve, 1938, colectados de *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766) en el extremo sur de Brasil. Los monogeneos fueron coloreados con cinco colorantes y montados entre la lámina y el cubreobjetos utilizando el medio de montaje de Faure. Los mejores resultados se obtuvieron con los especímenes coloreados con tricrómico de Gomori y carmín acético de Semichon. Los monogeneos coloreados con eosina y *fast green* presentaron resultados menos satisfactorios, especialmente porque no evidenciaron las estructuras de los sistemas reproductores. El análisis realizado después de años de preparación demostró que las características y condiciones de las coloraciones y preparados se mantuvieron en buen estado, garantizando la durabilidad. La técnica presentada es un método rápido y eficaz, y se presenta como una alternativa para el montaje de monogeneos, especialmente cuando se encuentran infrapoblaciones numerosas.

**Palabras clave:** carmín acético de Semichon – coloración – medio de Faure – método – montaje – tricrómico de Gomori

## INTRODUÇÃO

Um dos procedimentos para identificar uma espécie de parasito é a coloração dos espécimes, como é o caso dos monogenéticos, através de diferentes protocolos (Yamaguti, 1965; Pritchard & Kruse, 1982; Mo & Appleby, 1990; Amato *et al.*, 1991; Richards & Chubb, 1995; Deveney & Whittington, 2001; Chaudhary *et al.*, 2004; Cribb *et al.*, 2004; Eiras *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006; Košková *et al.*, 2010; García-Vásquez *et al.*, 2012; Justine *et al.*, 2012; Ayadi *et al.*, 2022; Nejat *et al.*, 2023; Ramírez-Cruz *et al.*, 2023). Essas técnicas foram desenvolvidas para processar espécimes para estudos morfológicos e mais recentemente, para pesquisas de obtenção de material genético e estudos moleculares.

Um dos problemas enfrentados pelos parasitologistas que estudam a morfologia dos helmintos, e particularmente dos monogenéticos, é a montagem permanente de espécimes em lâminas. Esse processo normalmente requer um corante, usualmente o tricrômico de Gomori, para evidenciar as estruturas morfológicas que serão úteis para a identificação (Amato *et al.*, 1991; Eiras *et al.*, 2006; Thatcher, 2006). Posteriormente à coloração, existe um processo de clarificação ou diafanização para incorporação em um meio de montagem. Para a clarificação dos monogenéticos, muitos protocolos apresentam a utilização de uma substância que na maioria das vezes é tóxica e/ou cancerígena (Brasil, Ministerio da Saúde, 2013), como é o caso do xileno e do creosoto de Faia (Yamaguti, 1965; Pritchard & Kruse, 1982; Amato *et al.*, 1991; Eiras *et al.*, 2006). Adicionalmente, a manipulação do material em contato com essas substâncias requer cuidado e a utilização de equipamentos de proteção individual e coletiva, como é o caso das cabines de segurança.

O meio de montagem de Faure constitui em um meio aquoso, com composição similar ao meio de Hoyer (Sewell *et al.*, 2006; Amato & Amato, 2010), que é muito utilizado para a montagem de monogenéticos (Eiras *et al.*, 2006; Thatcher, 2006). O meio de montagem de Faure vem sendo usado para a montagem de estruturas de diferentes grupos, como os temnocefalídeos (Seixas *et al.*, 2018), monogenéticos (Gallas *et al.*, 2014, 2015, 2016) e os cestoides (Silveira & Amato, 2008, 2010). Contudo, as preparações obtidas diretamente com o meio de montagem de Faure permanecem sem coloração, o que dificulta a visualização de estruturas internas.

Diferentes autores desenvolveram protocolos utilizando espécimes corados para a preparação em meios de montagem. Kritsky *et al.* (1978) apresentaram uma técnica na qual espécimes de monogenéticos foram corados pelo tricrômico de Gomori e após foram montados com meio

de montagem de Gray & Wess. Similarmente, Gallas *et al.* (2015) utilizaram uma técnica na qual monogenéticos foram corados pelo carmim de Semichon e montados com o meio de montagem de Faure. No presente estudo, foi avaliada a eficácia da técnica de Gallas *et al.* (2015) e a utilização de diferentes corantes com o meio de montagem de Faure.

## MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes de *Microcotyle pomatomi* Goto, 1900 e *Gotocotyla acanthura* (Parona & Perugia, 1896) Meserve, 1938 utilizados no presente estudo foram coletados de *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766) do município de Tramandaí, Rio Grande do Sul, extremo sul do Brasil. Os monogenéticos foram fixados em formalina 5% e conservados em etanol 70° GL (Gallas *et al.*, 2014). A identificação dos parasitos foi realizada de acordo com Yamaguti (1963) e Cohen *et al.* (2013).

Monogenéticos foram corados por 3 a 10 minutos em cada corante, de acordo com as fórmulas descritas em diferentes protocolos: tricrômico de Gomori (Humason, 1979), carmim acético de Semichon (Amato & Amato, 2010), hematoxilina de Delafield (Humason, 1979; Amato & Amato, 2010), eosina (Humason, 1979) e *fast green* (Humason, 1979). Posteriormente, cada espécime foi transferido com uma agulha histológica para uma lâmina com uma gota do meio de montagem de Faure e coberto com uma lamínula. A fórmula do meio de montagem de Faure utilizada seguiu Amato & Amato (2010).

Para comparar a eficácia da coloração e preparação, os espécimes foram observados logo após a montagem e acompanhados durante nove anos. As lâminas montadas foram armazenadas em caixas porta lâminas de material ABS (*acrylonitrile butadiene styrene*), com capacidade para 50 lâminas e mantidas em temperatura ambiente. Fotomicrografias foram realizadas utilizando uma câmera acoplada a um microscópio de luz. As lâminas foram depositadas na Coleção Helmintológica (CHMU) no Museu de Ciências Naturais da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), em Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Aspectos éticos:** os parasitos utilizados fazem parte do material da Coleção Helmintológica (CHMU 206, CHMU 222, CHMU 226) do Museu de Ciências Naturais da ULBRA, Brasil. Os peixes foram obtidos comercialmente, todos adquiridos mortos.

## RESULTADOS

Os monogenéticos utilizados apresentaram tamanho total do corpo entre 3,40 a 8,62mm. Os espécimes corados com tricrômico de Gomori e carmim acético de Semichon apresentaram os melhores resultados, com a maioria das estruturas morfológicas possíveis de visualização (Tabela 1, Fig. 1). Os monogenéticos corados com hematoxilina de Delafield apresentaram resultados pouco satisfatórios e os corados com eosina e o *fast green* apresentaram, principalmente, as estruturas relacionadas aos sistemas reprodutores de difícil ou nenhuma visualização (Tabela 1, Fig. 2).

Na preparação com o meio de montagem de Faure, foi visualizada uma pequena remoção dos corantes quando os espécimes foram transferidos para o meio. Adicionalmente, não foram observadas mudanças na coloração dos espécimes quando as lâminas foram reexaminadas através de microscopia após longo período (três, cinco e nove anos) da montagem. Pelas características do meio e por ser um meio de montagem temporário, não foram evidenciados danos a preparação, tampouco foi visualizada a formação de mofo nas extremidades da lamínula.

**Tabela 1.** Comparação das estruturas após utilização de diferentes corantes e montagem com meio de montagem de Faure.

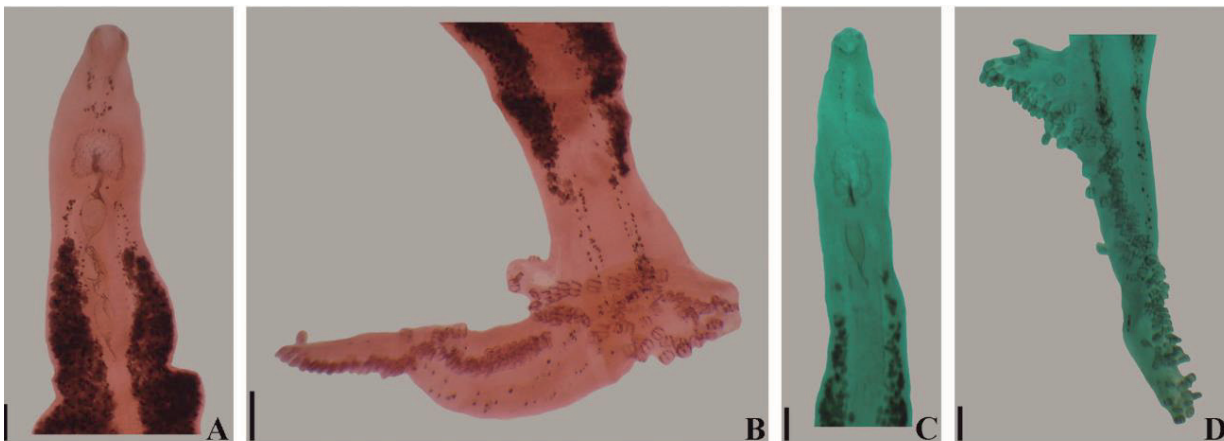
Estrutura	Tricrômico de Gomori	Carmim acético de Semichon	Corantes		
			Hematoxilina de Delafield	Eosina	<i>Fast green</i>
Glândulas cefálicas	+	+	+/-	+	+
Órgãos bucais	+	+	+	+	+
Faringe	+	+	+	-	+/-
Esôfago	+	+	+	+/-	+/-
Cecos intestinais	+	+	+	+	+
Átrio genital	+	+	+	+	+/-
Testículos	+	+	+	+/-	+/-
Vaso/canal deferente	-	-	-	-	-
Ovário	+	+	+/-	-	-
Vagina	+/-	+/-	-	-	-
Vitelário	+	+	+	+	+
Ducto vitelínico	+	+	+/-	-	-
Ovos	+	+	+	+	+
Grampos	+	+	+	+	+

Legenda = +: visualização possível; +/-: visualização parcial; -: não visualizado ou de difícil visualização.



**Figura 1.** Monogênicos corados e montados em meio de montagem de Faure: A e B, região anterior e posterior, respectivamente, de espécimes corados com carmalum acético de Semichon; C e D, região anterior e posterior, respectivamente, de espécimes corados com tricrômico de Gomori; E e F, região anterior e posterior, respectivamente, de espécimes corados com hematoxilina de Delafield. Barras = 150 µm





**Figura 2.** Monogenéticos corados e montados em meio de montagem de Faure: A e B, região anterior e posterior, respectivamente, de espécimes corados com eosina; C e D, região anterior e posterior, respectivamente, de espécimes corados com *fast green*. Barras = 150  $\mu$ m

## DISCUSSÃO

O meio de montagem de Faure foi utilizado no presente estudo pela similaridade ao meio de Hoyer (Eiras *et al.*, 2006; Thatcher, 2006; Amato & Amato, 2010). Os melhores resultados foram obtidos com os espécimes a partir de corantes já utilizados para o grupo dos monogenéticos, como o tricrômico de Gomori (Kritsky *et al.*, 1978; Eiras *et al.*, 2006; Thatcher, 2006) e o carmin acético de Semichon (Gallas *et al.*, 2015), um dentre os tipos de carmins utilizados para corar monogenéticos (Boudaya *et al.*, 2006; Chero *et al.*, 2018). Para a identificação dos gêneros de monogenéticos, é necessário observar as estruturas do haptor e sistemas reprodutores (Yamaguti, 1963), que poderão ser visualizadas nos espécimes preparados com os corantes supracitados.

Nas montagens realizadas no presente estudo, somente um pouco do corante foi removido quando os espécimes foram transferidos para o meio de montagem de Faure, característica também encontrada quando monogenéticos são montados pela técnica de Kritsky *et al.* (1978) (Thatcher, 2006). Nesta pesquisa, a técnica foi realizada com monogenéticos coletados de peixes marinhos, portanto a utilização de outros grupos de monogenéticos requer mais estudo, pois muitos possuem tamanho diminuto, como é o caso dos monogenéticos parasitos de peixes de água doce. Devido a composição do meio de montagem de Faure, os espécimes muito pequenos podem perder totalmente ou parcialmente o corante adquirido, limitando a técnica. Além disso, a qualidade dos espécimes relacionada com o tempo entre a coleta nos hospedeiros e a fixação dos tecidos, também influencia na coloração e montagem.

A técnica apresentada e comparada no presente estudo constitui em uma alternativa ao uso de substâncias com restrição de uso. Alguns pesquisadores têm utilizado o óleo de cravo nas preparações permanentes (Neifar *et al.*, 2000; Bullard *et al.*, 2003; Jithendran *et al.*, 2005; Boudaya *et al.*, 2006), como alternativa às substâncias como xileno e creosoto de Faia. Contudo, essas técnicas ainda requerem uma sequência de etapas de manipulação dos espécimes em diferentes substâncias, que podem causar a perda dos monogenéticos (Silveira & Almeida, 2014), principalmente devido ao tamanho dos espécimes. Uma vantagem que a técnica adaptada no presente estudo oferece é evitar a contínua manipulação supracitada. Outras vantagens incluem a simplicidade dos componentes utilizados na fórmula e a desnecessária utilização de equipamentos de laboratório como cabines de segurança, que devem ser usadas quando os espécimes são montados com creosoto de Faia (Pritchard & Kruse, 1982; Amato *et al.*, 1991; Eiras *et al.*, 2006).

As técnicas utilizadas por Kritsky *et al.* (1978), Gallas *et al.* (2015) e a apresentada neste estudo não substituem os procedimentos de coloração, diferenciação, desidratação e clarificação para a montagem em bálsamo do Canadá ou outra substância. Estas montagens são realizadas principalmente ao descrever uma espécie nova, nas quais alguns espécimes designados como o holótipo e os parátipos serão depositados em coleções de referência. A técnica apresentada no presente trabalho constitui uma alternativa à utilização de substâncias de uso restrito, principalmente se for possível a montagem de alguns espécimes de uma infrapopulação numerosa. Nestas condições, a presente técnica pode evidenciar

determinadas estruturas, permitindo a descrição morfológica.

## AGRADECIMENTO

Ao Tiago S. Sarmiento, pela coleta dos monogenéticos realizada durante o Trabalho de Conclusão de Curso e que foram utilizados no presente estudo.

## Author contributions: CRediT (Contributor Roles Taxonomy)

MG = Moisés Gallas

EFS = Eliane Fraga da Silveira

**Conceptualization:** MG, EFS

**Data curation:** MG, EFS

**Formal Analysis:** MG, EFS

**Funding acquisition:** MG, EFS

**Investigation:** MG, EFS

**Methodology:** MG, EFS

**Project administration:** MG, EFS

**Resources:** MG, EFS

**Software:** MG, EFS

**Supervision:** MG, EFS

**Validation:** MG, EFS

**Visualization:** MG, EFS

**Writing – original draft:** MG, EFS

**Writing – review & editing:** MG, EFS

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amato, J.F.R., Boeger, W.A., & Amato, S.B. (1991). *Protocolos para laboratório – coleta e processamento de parasitos do pescado*. Imprensa Universitária-UFRRJ.
- Amato, J.F.R., & Amato, S.B. (2010). Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves. In: Von Matter, S., Straube, F.C., Accordi, I.A., Piacentini, V.Q., Cândido-Jr, J.F. (Orgs). *Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento*. Technical Books (pp. 369-393).
- Ayadi, Z.E.M, Tazerouti, F., Gey, D., & Justine, J.L. (2022). A revision of *Plectanocotyle* (Monogenea, Plectanocotyliidae), with molecular barcoding of three species and the description of a new species from the streaked gurnard *Chelidonichthys lastoviza* off Algeria. *PeerJ*, 10, e12873.
- Brasil, Ministério da Saúde (2013). *Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.
- Boudaya, L., Neifar, L., & Euzet, L. (2006). *Plectanocotyle major* sp. n. (Monogenea: Plectanocotyliidae), a gill parasite of *Chelidonichthys obscurus* (Teleostei: Triglidae) from the Mediterranean Sea. *Folia Parasitologica*, 53, 53-56.
- Bullard, S.A., Goldstein, R.J., Hocking, R., & Jewell, J. (2003). A new geographic locality and three new host records for *Neobenedenia melleni* (MacCallum) (Monogenea: Capsalidae). *Gulf and Caribbean Research*, 15, 1-4.
- Chaudhary, A., Verma, C., & Singh, H.S. (2014). Ribosomal DNA as molecular markers and their applications in the identification of fish parasites (Platyhelminthes: Monogenea) from India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 82-84.
- Chero, J.D., Cruces, C.L., Sáez, G., Camargo, A.C.A., Santos, C.P., & Luque, J.L. (2018). *Hypanocotyle bullardi* n. gen. n. sp. (Monogenea: Hexabothriidae) from gill of the diamond stingray *Hypanus dipterus* (Jordan et Gilbert) (Myliobatiformes: Dasyatidae) in the Southeastern Pacific Ocean off Peru. *Parasitology International*, 67, 425-430.
- Cohen, S.C., Justo, M.C.N., & Kohn, A. (2013). *South American Monogeneoidea parasites of fishes, amphibians and reptiles*. Oficina de Livros.

- Cribb, B., Armstrong, W., & Whittington, I. (2004). Simultaneous fixation using glutaraldehyde and osmium tetroxide or potassium ferricyanide-reduced osmium for the preservation of monogenean flatworms: An assessment for *Merizocotyle icopae*. *Microscopy Research & Technique*, *63*, 102-110.
- Deveney, M.R., & Whittington, I.D. (2001). A technique for preserving pigmentation in some capsalid monogeneans for taxonomic purposes. *Systematic Parasitology*, *48*, 31-35.
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., & Pavanelli, G.C. (2006). *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*. Eduem.
- García-Vásquez, A., Shinn, A.P., & Bron, J.E. (2012). Development of a light microscopy stain for the sclerites of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 (Monogenea) and related genera. *Parasitology Research*, *110*, 1639-1648.
- Gallas, M., Calegari-Marques, C., & Amato, S.B. (2014). A new species of *Cacatuocotyle* (Monogenea, Dactylogyridae) parasitizing two species of *Astyanax* (Ostariophysi, Characidae) in southern Brazil. *Acta Parasitologica*, *59*, 638-642.
- Gallas, M., Silveira, E.F., & Périco, E. (2015). First report of *Pterinotrematoides mexicanum* Caballero & Bravo-Hollis, 1955 (Monogenea, Macroalvitrematidae) in *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes, Sciaenidae) from the coastal zone of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *CheckList*, *11*, 1568.
- Gallas, M., Calegari-Marques, C., & Amato, S.B. (2016). A new species of *Characithecium* (Monogenea: Dactylogyridae) from external surface and gills of two species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characidae) in southern Brazil. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *87*, 903-907.
- Humason, G.L. (1979). *Animal tissue techniques*. W. H. Freeman and Company.
- Jithendran, K.P., Vijayan, K.K., Alavandi, S.V., & Kailasam, M. (2005). *Benedenia epinepheli* (Yamaguti 1937), a monogenean parasite in captive broodstock of grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) (Forsk.). *Asian Fisheries Science*, *18*, 121-126.
- Justine, J.L., Briand, M.J., & Bray, R.A. (2012). A quick and simple method, usable in the field, for collecting parasites in suitable condition for both morphological and molecular studies. *Parasitology Research*, *111*, 341-351.
- Košková, E., Matějusková, I., Cíváňová, K., & Koubková B. (2010). Ethanol-fixed material used for both classical and molecular identification purposes: *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea: Diplozoidae) as a case parasite species. *Parasitology Research*, *107*, 909-914.
- Kritsky, D.C., Leiby, P.D., & Kayton, R.J. (1978). A Rapid Stain Technique for the Haptor Bars of *Gyrodactylus* Species (Monogenea). *Journal of Parasitology*, *64*, 172-174.
- Mo, T.A., & Appleby, C. (1990). A special technique for studying haptor sclerites of monogeneans. *Systematic Parasitology*, *17*, 103-108.
- Neifar, L., Euzet, L., & Ben Hassine, O.K. (2000). New species of the Monocotylidae (Monogenea) from the stingray *Dasyatis tortonesi* Capapé (Euselachii, Dasyatidae) off the Tunisian coast, with comments on host-specificity and the specific identities of Mediterranean stingrays. *Systematic Parasitology*, *47*, 43-50.
- Nejat, F., Benovics, M., Řehulková, E., Vukić, J., Šanda, R., Kaya, C., Tarkan, A.S., Abdoli, A., Aksu, S. & Šimková, A. (2023). Diversity, phylogeny and intraspecific variability of *Paradiplozoon* species (Monogenea: Diplozoidae) parasitizing endemic cyprinoids in the Middle East. *Parasitology*, *150*, 705-722.
- Pritchard, M.H., & Kruse, G.O.W. (1982). *The collection and preservation of animal parasites*. University of Nebraska Press.
- Ramírez-Cruz, E.S., Monks, S., Manríquez-Morán, N.L., Violante-González, J. & Pulido-Flores, G. (2023). New species of *Protomicrocotyle* (Monogenea: Protomicrocotylidae), and new information on *P. mirabilis*, parasites of *Caranx* spp. from Veracruz, México. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, *32*, e009523.



- Richards, G., & Chubb, J. (1995). Trichrome staining of *Gyrodactylus sclerites* and soft tissues following fixation in ammonium picrate-glycerin, including an improved rendition of the haptor bars of *G. turnbulli*. *Journal of Helminthology*, *69*, 149-154.
- Seixas, S.A., Dametto, N., & Périco, E. (2018). New species of *Temnocephala* (Platyhelminthes, Temnocephalida) ectosymbiont on vulnerable species of aeglids (Crustacea, Anomura) from the Neotropical Region. *Biota Neotropica*, *18*, e20170475.
- Sewell, K.B., Cannon, L.R.G., & Bray, R.A. (2006). A review of *Temnohaswellia* and *Temnosewellia* (Platyhelminthes: Temnocephalida: Temnocephalidae) ectosymbionts from Australian crayfish *Euastacus* (Parastacidae). *Memoirs of the Queensland Museum*, *52*, 199-280.
- Silveira, E.F., & Amato, S.B. (2008). *Diploposthe laevis* (Bloch) Jacobi (Eucestoda, Hymenolepididae) from *Netta peposaca* (Vieillot) (Aves: Anatidae): first record for the Neotropical Region and a new host. *Revista Brasileira de Zoologia*, *25*, 83-88.
- Silveira, E.F., & Amato, S.B. (2010). *Microsomacanthus hopkinsi* (Eucestoda, Hymenolepididae) in *Netta peposaca* (Aves, Anatidae). *Neotropical Helminthology*, *4*, 105-111.
- Silveira, A.C.A., & Almeida, K.S.S. (2014). Sobre variações na técnica de tricrômico de Gomori para estudo de helmintos da classe Monogeneoidea e família Dactylogyridae. *Perspectivas Online: Biológicas & Saúde*, *4*, 1-7.
- Thatcher, V.E. (2006). *Amazon Fish Parasites. Volume I*. Pensoft Publishers.
- Wong, W.L., Tan, W.B., & Lim, L.H.S. (2006). Sodium dodecyl sulphate as a rapid clearing agent for studying the hard parts of monogeneans and nematodes. *Journal of Helminthology*, *80*, 87-90.
- Yamaguti, S. (1963). *Systema Helminthum. Volume IV. Monogenea and Aspidocotylea*. Interscience Publishers.
- Yamaguti, S. (1965). Preparation of stained whole mounts of flatworms. *Transactions of the American Microscopical Society*, *84*, 602-603.

Received September 4, 2024.

Accepted October 11, 2024.