

4.9 REGISTRO DE PARÁSITOS. PROTOCOLOS EN CAMPO Y LABORATORIO

Cynthia Elizabeth González^{1,3} & Regina Draghi^{2,3}

¹ *Centro de Ecología Aplicada del Litoral (CECOAL), Ruta Provincial Número 5, km 2,5, C.P. 3400, Corrientes, Argentina.*

² *División Zoología Invertebrados, Museo de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Paseo del Bosque, s/n, C.P. 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.*

³ *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Godoy Cruz 2290, C1425FQB, CABA, Argentina.*

Al igual que el resto de los vertebrados, los anfibios son susceptibles a una gran variedad de parásitos y enfermedades, tanto bacterianas, como virales y fúngicas⁽¹⁻⁴⁾. Sin embargo, a excepción de hongos, virus y bacterias, el resto de estos organismos no representan una amenaza para la conservación de las poblaciones de anfibios^(5,6).

El estudio de los parásitos, en cualquier grupo de organismos, conlleva a poseer conocimientos referidos a tres elementos fundamentales y sus características: el hospedador (su tamaño corporal, tasa metabólica, hábitat, tamaño de la población, distribución geográfica, etc.), el parásito (tipo de ciclo de vida y número de hospedadores involucrados, tasa de transmisión, presencia o no de formas de resistencia, etc.) y, finalmente, el ambiente (temperatura, humedad, precipitaciones, etc.)⁽⁷⁻⁹⁾. Así, el estudio de los parásitos en los anfibios debe realizarse indefectiblemente con conocimiento de las historias de vida de los mismos. De allí, que los trabajos más interesantes referidos a la parasitofauna de los anfibios sean el resultado de un trabajo en conjunto entre parasitólogos y herpetólogos.

Los parásitos pueden ser clasificados de muy diversas maneras: según el lugar en que se encuentren en el cuerpo del hospedador (ectoparásitos/endoparásitos), según su tamaño (microparásitos/macroparásitos), según el sitio de infección (pulmonares, intestinales, hemáticos, etc.), según su clasificación sistemática (hongos, protozoos, platelmintos, nematodos, artrópodos, etc.). Desde luego, un parásito puede pertenecer a varias categorías; por ejemplo, una garrapata (*Arachnida*) es un macroparásito y, a la vez, un ectoparásito, mientras que un tripanosomátido (*Protozoa*) es un microparásito y un endoparásito (**Caja 4.9.1**).

La **Figura 4.9.1** muestra algunos de los principales grupos de parásitos que se han hallado en anfibios de Argentina.

Específicamente, en cuanto a las técnicas y metodologías empleadas, debido a la amplia gama de organismos que pueden actuar como parásitos en los anfibios, las mismas varían considerablemente. Nuestro objetivo, es exponer en este capítulo, cuáles de todos los protocolos establecidos para el estudio de los parásitos han sido los que más efectivos y prácticos han resultado (en cuanto a costos, material utilizado y tiempo, sobre todo en estudios realizados en el campo).

La metodología para el estudio de los parásitos en general ha sido compilada en algunas obras que abarcan diferentes grupos hospedadores de fauna silvestre⁽¹⁰⁻¹⁵⁾. Existen, por otro lado, trabajos de grupos parasitarios específicos que, si bien no hacen referencia concretamente a hospedadores anfibios, la metodología es aplicable para estos hospedadores (ver¹⁶⁻¹⁹). Trabajos espe-

Caja 4.9.1 - Principales grupos de organismos que se encuentran parasitando a los anfibios

Protozoos: endoparásitos, microparásitos. Los hallados en el tracto intestinal y en la sangre son los más comunes; con estadios fuera de los anfibios que ocurren tanto en el ambiente (en los enteroparásitos), como en hirudíneos y artrópodos vectores (hemoparásitos).

Helmintos: este es un grupo artificial que reúne a platelmintos (trematodes y cestodes), nematodes y acantocéfalos. Son, en general, macroparásitos que se encuentran dentro del cuerpo de los anfibios, tanto en la luz de los distintos órganos, como en la cavidad del cuerpo, o bien, en el parénquima de órganos como riñón e hígado. La mayoría de las especies de este grupo presentan ciclos heteroxenos por lo que otros organismos están vinculados a ellos como hospedadores intermediarios (moluscos, insectos, crustáceos, etc.) o vectores (insectos hematófagos).

Anélidos: macroparásitos, ectoparásitos/endoparásitos. Pasan la mayor parte de su vida como organismos de vida libre; sin embargo, en el caso de las sanguijuelas, se adhieren temporalmente a los anfibios (tanto renacuajos como adultos) para alimentarse mediante la succión de sangre (ectoparásitos). En el caso de los oligoquetos, los mismos penetran por la cloaca y se disponen en los uréteres de los hospedadores adultos (endoparásitos).

Artrópodos: macroparásitos, ectoparásitos/endoparásitos. Dentro de los artrópodos ectoparásitos se encuentran garrapatas y ácaros (Arachnida) y dípteros (Insecta). Presentan ciclos directos, pero con algunos estadios que se desarrollan en el ambiente; se encuentran en anfibios adultos asociados al ambiente terrestre. En el caso de los ácaros y los dípteros son los estadios larvales las formas parasitarias; en el caso de las garrapatas, tanto larvas como adultos son parásitos. Por otro lado, copépodos del género *Learnaea* son eventualmente hallados en renacuajos; primariamente parásitos de peces, son conocidos como gusanos ancla. Solamente la hembra es parásita (el macho muere luego de la cópula). Como artrópodos endoparásitos, se encuentra un grupo de crustáceos de la subclase Pentastomida, los gusanos lengua, que, además de anfibios, parasitan el sistema respiratorio de reptiles y mamíferos.

cíficos para el estudio de helmintos en peces y aves^(20,21), son asimismo ampliamente consultados por parasitólogos de anfibios. Concretamente, para el estudio de parásitos en anfibios existen dos trabajos que resumen las principales técnicas para llevarlos a cabo^(22,23).

En general, el estudio de los parásitos puede resumirse en los siguientes pasos: *colecta, fijación, coloración, identificación y conservación*. En cada uno de ellos la metodología varía de acuerdo al grupo parasitario estudiado y, en

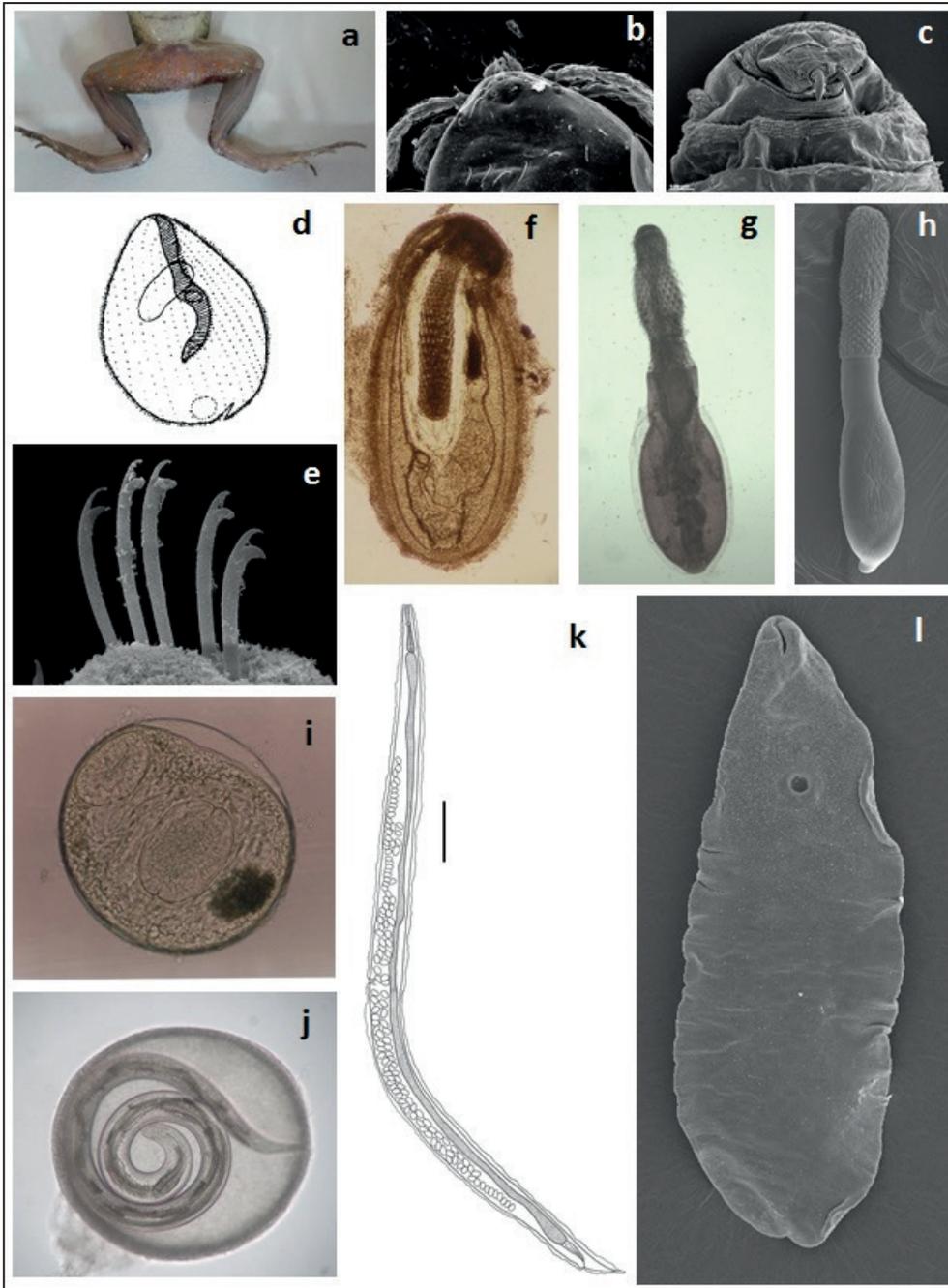


Figura 4.9.1 Representantes de algunos grupos de parásitos hallados en anfibios. (a) Ácaros en las extremidades posteriores de un ejemplar juvenil de *Leptodactylus luctator*. (b) Detalle de la extremidad anterior de ácaro colectados en *Leptodactylus macrosternum*, microscopia electrónica de barrido. (c) Larva de Sarcophagidae, detalle de extremidad anterior, microscopia electrónica de barrido. (d) Protozoos intestinales del género *Nyctotherus*, microscopia óptica. (e) Oligoquetos del género *Dero*, detalle de las quetas, microscopia electrónica de barrido. (f — h) Larvas de acantocéfalos del género *Centrorhynchus*, probóscide invaginada (f), probóscide evaginada (g, h), microscopia óptica (f, g) y microscopia electrónica de barrido (h). (i) Metacercaria enquistada del género *Truvrema*, microscopia óptica. (j) Nematode larval enquistado de la superfamilia Seuratoidea, microscopia óptica. (k) Nematode adulto del género *Rhabdias*, microscopia óptica. (l) Digeneo adulto del género *Glypthelmins*, microscopia electrónica de barrido. Fotos: a: R. Draghi; b, d-l: C.E. González; c: E. Schaefer y M. Duré.

algunos casos, algún paso no es imprescindible (por ejemplo, la coloración en los nematodos). Algunas técnicas como la plastinación desarrollada más recientemente para parásitos del grupo de los helmintos^(24,25), son más ventajosas en cuanto a que no utilizan sustancias como formaldehído o alcohol; sin embargo, su aplicación no está muy difundida por el momento.

Los parásitos no proporcionan sonidos, olores y otros atributos que, en el caso de otros organismos, ayudan en su identificación. Además, en relación a su tamaño más bien pequeño, el estudio de los parásitos requiere, casi en la totalidad de los casos, del uso de material óptico⁽²⁶⁾. Por ejemplo, aún para los parásitos de mayor tamaño y, aún si son ectoparásitos, es necesario utilizar microscopio estereoscópico, para que, en el momento de la colecta no se dañen órganos tales como los de fijación.

La identificación taxonómica se basa, en general, en estructuras anatómicas internas de tamaño muy pequeño que deben observarse, en algunos casos, con objetivo de inmersión (ej. papilas caudales en nematodos, estructura del cirro en digeneos, distintas organelas en los protozoos, etc.). Un gran paso en el estudio de los parásitos fue el uso de la microscopía electrónica de barrido. Los primeros aportes para la preparación de helmintos observados con esta técnica fueron realizados en la década del 70⁽²⁷⁾; posteriormente, se realizaron contribuciones en cuanto al uso de la microscopía electrónica de barrido en algunos grupos particulares de helmintos como los nematodos⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Por otro lado, en la actualidad, prácticamente no existe grupo de organismos que no sean analizados mediante técnicas de biología molecular y los parásitos no son la excepción⁽³¹⁾. Trabajos específicos pueden consultarse para llevar adelante este tipo de estudio en diferentes grupos como tripanosomátidos⁽³²⁾; helmintos⁽³³⁻³⁵⁾ y garrapatas^(36,37).

Más recientemente, métodos moleculares a través de coprodiagnósticos han sido desarrollados para la identificación cualitativa de nematodos en anfibios y reptiles, si bien hasta el momento, no son ampliamente aplicados⁽³⁸⁾.

En referencia a las malformaciones producidas por parásitos, existe un grupo de metazoos parásitos, específicamente, digeneos de los géneros *Ribeiroia* y *Acanthostomum* que han sido relacionados con, por ejemplo, dedos y extremidades supernumerarias y malformaciones axiales y de extremidades, respectivamente⁽³⁹⁻⁴²⁾. Hasta el momento, en Argentina solamente el género *Ribeiroia* fue registrado en estado de cercarias emergidas de planorbídeos de Salta y Corrientes⁽⁴³⁾ y, como adulto, en aves de Formosa y Buenos Aires⁽⁴⁴⁾, no hallándose en anfibios.

Cabe aclarar que no existe un método único para estudiar a los diferentes grupos de parásitos de los anfibios. Cada investigador, a medida que avanza en los análisis, puede desarrollar nuevos métodos, aplicar otros, insertar cambios en los ya conocidos; en fin, realizar todo aquello que le otorgue mayor beneficio y conveniencia en cuanto a practicidad y costos, por ejemplo.

En Argentina, el estudio de los parásitos en anfibios adultos abarcó en gran medida a los helmintos, de los cuales se han realizado estudios de carácter sistemático y ecológico y que continúan actualmente en desarrollo. Respecto a digeneos, nematodos y acantocéfalos pueden consultarse listas de especies para hospedadores anfibios^(45,46), y para vertebrados en general⁽⁴⁷⁾. Otros grupos de parásitos fueron escasamente estudiados en comparación con los helmintos y de ellos, se cuenta con trabajos puntuales de registros geográficos u hospedatorios (ver para protozoos:⁴⁸⁻⁵¹; para ácaros:⁵²⁻⁵⁴; para garrapatas:^{55,56}). Lo mismo sucede con parásitos en anfibios larvales donde los helmintos fueron los más estudiados⁽⁵⁷⁻⁶⁰⁾; existiendo registros escasos de otros grupos en renacuajos^(61,62).

Hongos y mohos que afecten a anfibios de Argentina y su metodología de estudio serán tratados en la **Sección 4.10 Registro de hongos. Protocolos en campo y laboratorio**. En lo que respecta a virus y bacterias, este es un tema muy poco desarrollado en nuestro país; existe un solo reporte de ranavirus en la provincia de Neuquén⁽⁶³⁾ por lo que este grupo debería ser considerado para estudios futuros. Finalmente, no hay registros, hasta el momento, de hirudíneos ni pentastómidos en anfibios argentinos; solamente se cuenta con observaciones no publicadas de alguno de estos grupos (ej. oligoquetos en uréteres de *Trachycephalus typhonius*; ver **Figura 4.9.1**; obs. pers. C.E.G.).

Métodos, técnicas y/o equipamientos

Para el análisis parasitológico, el número de anfibios colectados dependerá del objetivo del trabajo a desarrollar (ej. estudios de carácter sistemático, reportes de nuevas localidades u hospedadores, estructura de la comunidad parasitaria, dinámica espacial y/o estacional de los parásitos, etc.). De cualquier manera, antes de iniciar la colecta de los hospedadores es necesario conocer el grado de amenaza de cada especie; para ello puede consultarse la Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina⁽⁶⁴⁾ y el sitio web de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza⁽⁶⁵⁾.

El mejor momento para iniciar el examen de los hospedadores anfibios y sus parásitos es aquel inmediatamente después de la colecta, en lo posible, en el campo, luego de haber concluido el muestreo y la toma de las respectivas variables ambientales. Esto evitará el estrés de los hospedadores producido por el traslado hasta el laboratorio. Esta acción realizada en el campo, reporta un beneficio cuando se realizan campañas a sitios muy alejados del lugar de trabajo y que hacen que el traslado de los hospedadores sea algo complejo

o difícil, sobre todo por el espacio disponible en los viajes de campaña que, en la mayoría de los casos, es mínimo. Si el lugar de muestreo se encuentra cercano al laboratorio, entonces la tarea se ve facilitada y el examen de los anfibios puede realizarse perfectamente en el laboratorio. Recordar siempre que, si los anfibios deben ser trasladados, esto debe realizarse en las mejores condiciones posibles; para ello, se adecuarán recipientes para tal fin (terrarios o acuarios dependiendo de la especie) que los contendrán hasta el momento de su examen.

El estudio de los endoparásitos de anfibios requiere que los especímenes sean eutanasiados; por lo tanto, una manera de maximizar el material examinado es, en la medida de lo posible, coleccionar la mayor cantidad de datos de un solo ejemplar hospedador. Por ejemplo, del mismo anfibio pueden extraerse y fijarse, además de los parásitos hallados en los distintos sistemas de órganos, el contenido estomacal para estudios tróficos, las gónadas para estudios de carácter reproductivo, morfológico o fisiológico, tejido para posteriores estudios moleculares, etc.

Es necesario aclarar que, en general, cuando se aborda el estudio de los parásitos en anfibios, no se abarcan todos los grupos de organismos que puedan encontrarse parasitando a una especie hospedadora. Comúnmente, los estudios de parásitos de anfibios refieren a sus hemoparásitos, a sus ectoparásitos, a sus helmintos parásitos (incluso pueden ser más específicos y referirse solamente a helmintos intestinales) o, a sus ectoparásitos.

Por otro lado, una gran diferencia en la metodología de estudio entre los microparásitos (ej. protozoos hemáticos) y los macroparásitos (ej. los helmintos), es que, en general, en el primer caso, no se contabilizan la totalidad de los individuos; mientras que, en el segundo caso, la totalidad de la muestra es contabilizada. Sin embargo, en el caso de los protozoos hemáticos, sí es posible proporcionar datos como, por ejemplo, porcentaje de hospedadores parasitados (prevalencia de infección) y una estimación de la abundancia, por ejemplo: número de parásitos en cierta cantidad de campos al microscopio o, en un período de tiempo fijo.

Colecta de los hospedadores:

Adultos: serán colectados mediante distintas técnicas según la conveniencia y según el tipo de estudio que se llevará adelante. Los diferentes tipos de colecta, ej. trampas de caída, inspección por encuentros visuales, redes para especies acuáticas, etc., de anfibios adultos se desarrollan en la **Sección 3.3.**

Renacuajos: serán colectados mediante copos o redes en los cuerpos de agua y mantenidos en recipientes preparados para contenerlos hasta el momento del examen parasitológico. Ver detalles de colecta de renacuajos en la **Sección 3.2**.

Datos a registrar:

Del hospedador: especie, longitud, peso, sexo (en adultos); especie, longitud, peso, estadio de Gosner⁽⁶⁶⁾ (en renacuajos).

Del ambiente: temperatura, humedad, hábitat donde fue colectado el anfibio (para adultos); temperatura, oxígeno disuelto, pH del cuerpo de agua (para renacuajos), además de la fecha y las coordenadas geográficas, en ambos casos.

En el estudio de los parásitos de los anfibios, es necesario registrar en el campo otras variables además de las que comúnmente se consignan y las mismas son, por ejemplo, presencia de moluscos (primeros hospedadores intermediarios de digeneos), presencia de sanguijuelas (vectores de tripanosomátidos) y, presencia de posibles hospedadores definitivos (aves, mamíferos, reptiles), entre otras.

Eutanasia:

La eutanasia de los anfibios puede realizarse por diferentes métodos que se encuentran detallados en la **Sección 5** del presente Manual. En los estudios parasitológicos el método más empleado por su fácil aplicación es el uso tópico de una solución en gel de benzocaína al 10% o al 20%.

Si bien la metodología parasitológica comprende una serie consecutiva de pasos igualmente importantes para el éxito de la investigación y que, en algunos casos pueden prolongarse significativamente (por ejemplo, cuando el hospedador se encuentra en extremo parasitado), es necesario aclarar aquí la importancia del tratamiento que se proporciona también a los ejemplares anfibios. El tratamiento del hospedador debe ser considerado un paso más en la metodología de los estudios parasitológicos y esto se debe a que, al momento de publicar los resultados, así como los especímenes parásitos deben estar depositados en una colección, también deben estarlo los hospedadores, por lo que la fijación y conservación de los mismos debe ser la correcta. De esta manera los parasitólogos pueden contribuir a la conservación de los hospedadores ya sea en su totalidad o por medio de muestras de tejidos de los mismos^(67,68).

A partir de aquí, las actividades serán separadas en dos apartados: *actividades realizadas en el campo* y *actividades realizadas en laboratorio*. En la primera sección, se incluyen los pasos que se inician con la necropsia del hospedador hasta la fijación y conservación de los parásitos en los respectivos viales o

ependorf que serán trasladados al laboratorio. En la segunda sección, se incluyen las actividades relacionadas al tratamiento de los parásitos para su respectiva identificación, hasta el depósito de los mismos en las colecciones pertinentes.

Caja 4.9.2 - Colectas a partir de hospedadores congelados

Al igual que los parásitos colectados de hospedadores fijados (por ejemplo, aquellos depositados en una colección), los parásitos colectados de material congelado suponen una dificultad para su estudio morfológico. El primer inconveniente radica en la falta de movimiento de los mismos, esto es importante para casos de parásitos de tamaño muy pequeño ya que muchos de ellos pueden ser omitidos en la colecta por la falta de movimiento. En el caso de las metacercarias, el individuo entero puede ser totalmente destruido. Con parásitos de mayor tamaño, puede suceder que, en el caso de los cistacantos que presenten sus probóscides invaginadas, no será posible el conteo y estudio de la morfología de los ganchos; en los nematodos, las bolsas copulatrices permanecerán contraídas; en los digeneos pueden perderse espinas del tegumento, entre otras consecuencias. En síntesis, se verá afectada tanto la anatomía interna como externa de los parásitos. Solamente la utilización de nitrógeno líquido o, una mezcla de hielo seco y etanol pueden arrojar resultados considerables para realizar estudios morfológicos, pero esto no es algo que comúnmente se utilice. Por lo tanto, no es recomendable el uso de especímenes colectados de hospedadores congelados para estudios morfoanatómicos, si bien, pueden conservarse para material didáctico, por ejemplo.

1. En el campo:

Equipamiento: para realizar el análisis de los anfibios y la colecta de parásitos en el campo se debe contar con un microscopio estereoscópico que sea fácilmente trasladable y con un mínimo indispensable de instrumentos para proceder con el examen como ser: tijeras, bisturí, pipetas, pinceles, cápsulas de Petri, solución fisiológica, eppendorf, tubos de ensayo, mechero o vela, líquido fijador, líquido conservante, rótulos (**Figura 4.9.2**).

En caso de no contar con instrumental óptico (lupa) para trasladar al campo, los anfibios deben ser transportados en las mejores condiciones posibles al laboratorio y allí, colocarlos en terrarios o ambientes especialmente acondicionados que los contengan, hasta el momento del análisis que debe ser lo más pronto posible.

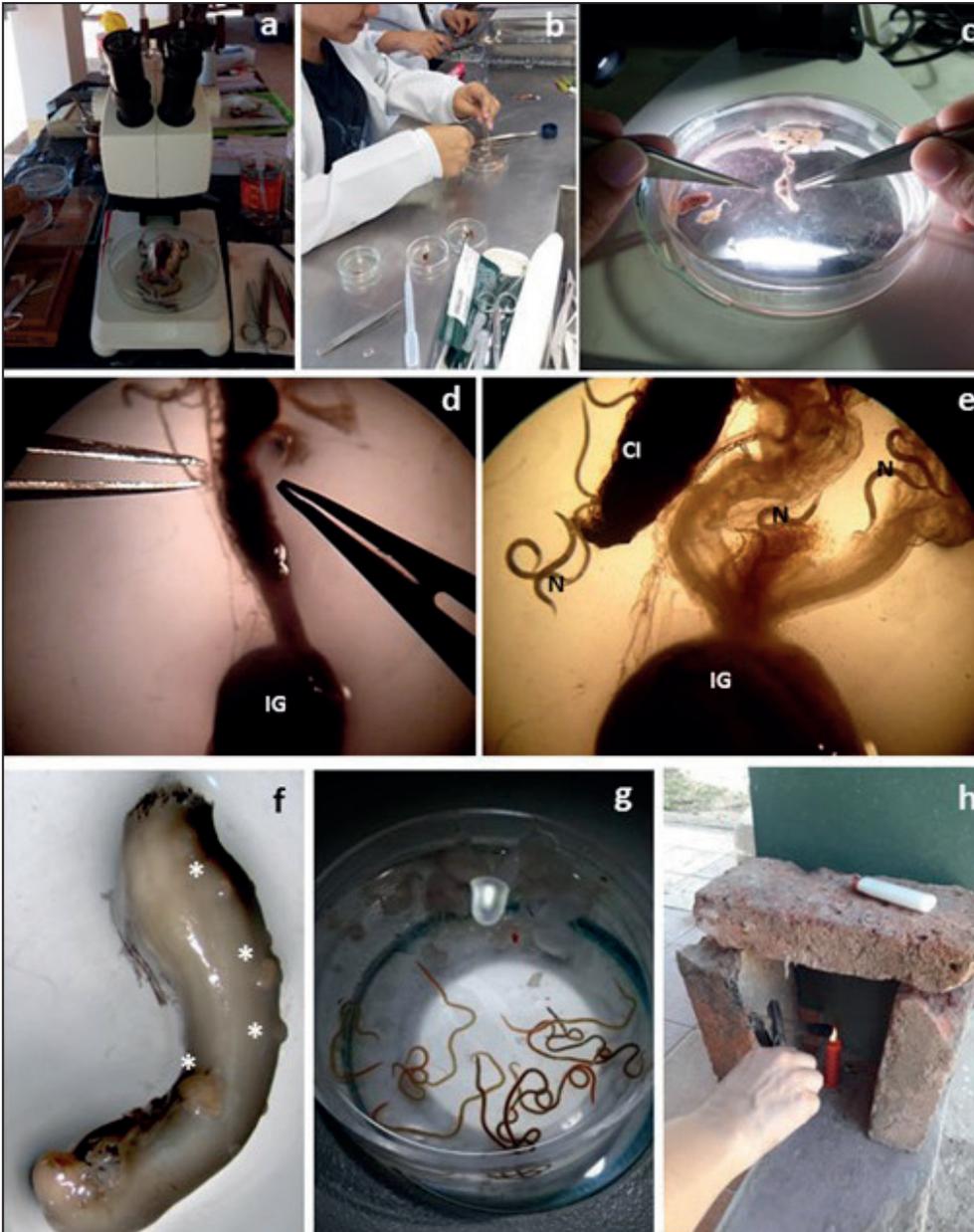


Figura 4.9.2. Análisis parasitológico interno de los anfibios. (a) Incisión longitudinal ventral rostro-cloaca para la posterior extracción de los sistemas de órganos. (b) Separación de los sistemas de órganos en cápsulas de Petri con solución fisiológica. (c) Examen del sistema digestivo en microscopio estereoscópico con iluminación inferior. (d, e) Examen de intestino delgado. Utilización de pinzas de punta fina; intestino aún no abierto (d); intestino abierto mostrando contenido intestinal y nematodos intestinales (e). (f) Estómago de anfibio mostrando en su pared externa numerosos quistes de nematodos. (g) Nematodos intestinales en cápsula de Petri con solución fisiológica. (h) Calentamiento de solución fijadora en el campo. Fotos: a, b, d, e, f, h: C. E. González; c, g: S. Palomas

* quistes de nematodos; IG: intestino grueso; CI: contenido intestinal; N: nematodos.

Tanto para anfibios adultos como para renacuajos es necesario llevar un registro de la prospección cuyo formato y organización queda a criterio del investigador. Se proporciona un ejemplo de planilla en el **Anexo I**. Además de los campos para los órganos prospectados, esta ficha contiene en su encabezado otros datos con información referida al hospedador y a la localidad y fecha de captura del mismo.

1. a- Anfibios adultos:

1.a.a. Estudio de los parásitos hallados sobre la superficie del cuerpo:

Tres grupos principales de invertebrados pueden ser hallados externamente enquistados o adheridos por alguna adaptación a la superficie externa del cuerpo de los anfibios:

- Helmintos: metacercarias ubicadas entre la dermis y la epidermis.
- Anélidos: hirudíneos (sanguijuelas) adheridas por su ventosa anterior.
- Artrópodos: larvas de dípteros que forman úlceras, ácaros en la dermis, garrapatas solamente adheridas por sus piezas bucales.

En primer lugar, se realiza un examen macroscópico de la superficie externa del anfibio, si es necesario, bajo microscopio estereoscópico. Deben examinarse tanto la parte dorsal como la ventral del cuerpo. Observar también con detenimiento la cavidad bucal, debajo de la lengua, y los ojos⁽²²⁾.

Extracción y fijación:

Helmintos:

Metacercarias: Se las encuentra como protuberancias tegumentarias como en el caso de los ácaros, pero sin presentar el típico color rojizo de los mismos. Las metacercarias presentan, en general, un color blanquecino, pero también pueden encontrarse metacercarias amarillentas o marrones. Deben retirarse cuidadosamente los quistes con ayuda de pinzas de punta fina; luego de retirada es conveniente realizar un dibujo con cámara clara de la metacercaria enquistada para documentar la forma y tamaño. Luego, se rompe cuidadosamente la pared quística con ayuda de agujas histológicas para que quede libre y se procede a la fijación. Algunas metacercarias presentan la pared quística más débil y el simple hecho de realizar una pequeña presión con un cubreobjetos, produce la rotura de la pared del quiste y deja libre el digeneo larval.

Fijación: existen una gran cantidad de fijadores para helmintos parásitos (ver **Anexo II**); sin embargo, el más recomendable sigue siendo el formaldehído: formaldehído al 5% en el caso de las metacercarias y al 10% en el caso de los helmintos adultos. Si no se utilizara formaldehído, puede utilizarse alcohol 70%.

El fijador **siempre** debe calentarse. Aproximadamente, 5-10 ml de fijador se calientan en un tubo de ensayo hasta que comience a burbujear y se vuelca sobre la cápsula que contiene a los helmintos de donde previamente se ha quitado toda la solución fisiológica posible (**Figura 4.9.2**).

Si el fijador no se calienta, al volcarlo sobre los helmintos, el cuerpo de los mismos se fijará, pero contraído, lo que hará que ese espécimen no pueda es-

tudiarse posteriormente de la manera correcta. Los ejemplares fijados en formaldehído pueden conservarse en los mismos eppendorf pero es importante que, luego de un tiempo (no más de 3 meses), se los traspase a alcohol 70% ya que el formaldehído endurece los tejidos. Los helmintos así conservados con sus respectivos rótulos, serán trasladados al laboratorio para continuar con su identificación.

A tener en cuenta: cuando la muestra así lo permita (el n° de parásitos hallados es considerable), deben colocarse algunos ejemplares en alcohol absoluto para su posterior estudio molecular. Para ello, se recomienda su conservación en alcohol absoluto y posterior almacenaje en refrigerador.

Anélidos:

Sanguijuelas: son organismos muy musculares y se encuentran fuertemente adheridos a la piel de los anfibios. Para desprenderlas del anfibio en primer lugar se debe identificar el extremo oral succionador que generalmente es el más delgado de la sanguijuela, luego colocar la uña o algún objeto plano como una hoja, también puede ser un cordón o hilo grueso, sobre la piel adyacente a la ventosa y deslizarlo debajo para ir desprendiendo lentamente la extremidad. Debe repetirse el proceso con el extremo posterior que generalmente es el extremo más grueso e hinchado. Las sanguijuelas deben encontrarse completamente relajadas al momento de fijarlas. Si se las coloca en un fijador a temperatura ambiente se contraen por lo que hay que narcotizarlas previamente; además, deben ser registrados los colores de las superficies dorsal y ventral del cuerpo debido a que los cromatóforos, en general, se disuelven con los narcotizantes. Para relajarlos, el método más conveniente es agregar lentamente al agua que contiene el ejemplar, gotas de alcohol 95% incrementando la concentración por 30 minutos hasta que cese el movimiento. Cuando el espécimen ya se encuentre relajado y no responda a estímulos, pasarlo entre los dedos para retirar el exceso de moco. Para algunos especímenes es conveniente realizar un aplastamiento entre dos vidrios, agregando peso si fuera necesario⁽¹⁹⁾.

Fijación: luego de la relajación, las sanguijuelas deben fijarse por 24 horas (dependiendo del tamaño) en formaldehído 5-10% ; para ello, las sanguijuelas deben ser comprimidas entre dos portaobjetos colocándole un peso encima. Existen otros métodos de relajación (uso de cristales de mentol, agua gasificada con CO₂, utilización de Nembutal al 6%) y fijación de sanguijuelas (A.F.A., Bouin, Fleming) pero como para el trabajo de campo siempre se cuenta con etanol y formaldehído es que sugerimos la descrita.

Caja 4.9.3 Acerca de los parásitos colectados en estudios no parasitológicos

En muchas ocasiones, colegas herpetólogos proporcionan material parasitológico que han obtenido durante sus propias colectas realizadas para otros fines no parasitológicos. Este material, al igual que los parásitos que se encuentran en anfibios depositados en colecciones herpetológicas, constituyen una importante fuente de datos. Sin embargo, como se detalla, la fijación de los parásitos es un paso fundamental para su posterior determinación y no hacerlo de la manera correcta podría provocar daños en el espécimen y su estudio se vería muy comprometido. El estudio de este tipo de material no es imposible; sin embargo, no se recomienda para un investigador que se inicie en el estudio de los parásitos.

Artrópodos:

Larvas de dípteros (más comúnmente de las familias Sarcophagidae y Calliphoridae): las larvas de moscas provocan úlceras en donde los huevos fueron depositados. Las larvas se van alimentando del tejido del anfibio y terminan matándolo. Estas larvas se extraen con ayuda de pinzas de punta fina con delicadeza intentando no romperlas. Una vez extraídas del cuerpo del anfibio se las mata y relaja mediante agua hirviendo⁽⁶⁹⁾.

Fijación: se las fija y almacena en viales con alcohol 80% con las respectivas etiquetas. Si se quisieran obtener adultos de los dípteros, debe dejarse un número de larvas en los hospedadores parasitados para obtener luego las pupas y moscas adultas emergidas.

Ácaros y garrapatas: estrictamente, las larvas de ácaros son endoparásitos ya que atraviesan la piel de los mismos y se encapsulan en el estrato dérmico. Se observan como pequeñas prominencias tegumentarias sobre todo en la parte ventral y la parte interior de las extremidades posteriores. Comúnmente presentan color naranja o rojo (**Figura 4.9.1**). Para extraerlas, se rompe cuidadosamente la prominencia y se saca el ácaro con ayuda de una pinza de punta fina. Se los conserva en alcohol al 70% en eppendorf con sus respectivos rótulos⁽⁷⁰⁾.

Las garrapatas (verdaderos ectoparásitos), se retiran de los hospedadores con ayuda de pinzas siempre tratando de que el hipostoma (estructura que forma parte de las piezas bucales) no se rompa y permanezca dentro del hospedador. Se las coloca en alcohol 70% u 80% a 70°C para que sus apéndices queden estirados⁽⁷⁰⁾. La extracción de los especímenes debe realizarse lenta y suavemente para no romper el ejemplar, ejerciendo una tracción gradual y constante. Se debe evitar dañar las garrapatas de gran tamaño con la pun-

ta de las pinzas. Al extraer la garrapata posiblemente un pequeño trozo de piel del hospedador quede adherido a las piezas bucales; el mismo puede quitarse posteriormente con ayuda de pinzas y tijeras finas. La extracción descuidada de las garrapatas puede resultar en que las mismas sean inútiles para la identificación taxonómica⁽¹⁷⁾.

Fijación: ácaros y garrapatas pueden fijarse en alcohol 70% o alcohol 80%, como así también en formaldehído al 5%. Cuando los especímenes vayan a utilizarse para disecciones detalladas o cortes microscópicos, se recomienda fijarlos en alcohol, formaldehído, acético (A. F. A.).

1.a.b. Estudio de los parásitos hallados dentro del cuerpo de los anfibios:

Cuatro grupos de invertebrados pueden ser hallados como endoparásitos de los anfibios, si bien, los más comunes y numerosos son los helmintos:

- Protozoos: principalmente en sangre e intestino.
- Helmintos: adultos en órganos huecos como intestino, pulmón, vejiga urinaria, vesícula biliar; larvas en hígado, mesenterios, cavidad del cuerpo, hígado, riñones, pared de los órganos huecos, musculatura principalmente de las extremidades posteriores y sangre (filarias).
- Anélidos: oligoquetos en uréteres.
- Artrópodos: pentastómidos en pulmones.

Extracción y fijación:

Para la colecta de parásitos sanguíneos no es necesario realizar incisión alguna en el hospedador; mientras que, para los protozoos intestinales y el resto de los parásitos, luego de la eutanasia, se procede a realizar con un bisturí o tijera, una incisión ventral que se extienda desde la boca hasta la cloaca.

Luego de la incisión ventral, se retiran todos los sistemas de órganos y, por separado, se colocan en cápsulas de Petri con solución fisiológica (**Figura 4.9.2**). Esta es la solución fisiológica común que puede adquirirse en las farmacias.

Antes de comenzar con el examen de los órganos internos, se procede a observar la cavidad del cuerpo del hospedador en búsqueda de, por ejemplo, metacercarias enquistadas o nematodos filarideos adultos. Una vez finalizado este examen se inicia el examen de los distintos sistemas de órganos.

En el caso de órganos huecos (intestino, pulmones, vejiga urinaria) los mismos deben ser examinados externamente ya que muchos estados larvales

de acantocéfalos (cistacantos) y digeneos (metacercarias) pueden enquistarse en su pared externa. Luego, estos órganos huecos deben ser cortados cuidadosamente en sentido longitudinal para ser examinados internamente. En general, la pared del intestino no es tan gruesa como la del estómago; en este caso dos pinzas de punta fina son suficientes para realizar la incisión longitudinal del órgano (**Figura 4.9.2**).

El sistema digestivo, sobre todo en anfibios de gran tamaño, debe ser separado en estómago, intestino delgado e intestino grueso, en cápsulas de Petri diferentes y analizados separadamente.

Todos los parásitos hallados en un mismo órgano (por ejemplo, intestino grueso) deben colocarse en una cápsula más pequeña con solución fisiológica por unos minutos (**Figura 4.9.2**). El objetivo de este paso es que, al moverse dentro de la cápsula, sobre todo los helmintos, se desprendan de la suciedad que pueda quedar adherida a la superficie de su cuerpo (por ejemplo, restos de materia no digerida) y que luego, al momento de su identificación entorpezcan esta tarea. En este paso, algunos helmintos adultos al ser colocados en solución fisiológica comienzan a eliminar huevos. Esto no resulta un problema, al contrario, podría considerarse una ventaja ya que, un útero colmado de huevos puede dificultar la observación de estructuras reproductivas que son importantes para la identificación.

Los helmintos pueden ser extraídos de los órganos mediante el uso de agujas histológicas, pinzas de punta fina o pinceles finos; de igual manera, pueden utilizarse pipetas de punta fina, cuidando de que no queden pegados a su pared.

Por último, algunos helmintos de pequeño tamaño como formas larvales de nematodos, machos de algunas especies de nematodos o metacercarias, pueden pasarse por alto en el recuento de especímenes. Para ello, es recomendable colocar un trozo del órgano en cuestión, entre dos portaobjetos, aplastarlo ligeramente y observarlo en el microscopio estereoscópico utilizando la iluminación inferior.

Protozoos:

Hemoparásitos: para la obtención de protozoos como los del género *Trypanosoma* debe realizarse una micropunción del corazón utilizando una jeringa con aguja de las de insulina previamente heparinizada. Se coloca una gota de la sangre extraída en el extremo de un portaobjetos y se realiza un frotis. Para ello uno de los lados de un segundo portaobjetos (“extensor”) se dis-

pone sobre la mitad de la gota de sangre que por capilaridad se desplazará hacia ambos extremos ocupando todo el ancho del portaobjetos, y luego, con una inclinación del extensor de 45°, se desplaza el borde del mismo hacia el otro extremo del portaobjetos, contrario al lugar donde estaba la gota⁽²²⁾.

Una detección más rápida puede realizarse mediante un centrifugado de la sangre del anfibio con tubos de hematocrito heparinizados^(71,23); en este caso la sangre se extrae de la misma manera que como fuera explicada previamente.

Fijación: en cuanto a los extendidos sanguíneos para la observación de protozoos, los mismos deben ser fijados con metanol 96%. Para ello, luego que el frotis se ha secado, se sumerge el portaobjetos en una cápsula de Petri con metanol durante 3 minutos. Así fijados, los portaobjetos conteniendo el frotis sanguíneo pueden ser trasladados al laboratorio para continuar con la coloración respectiva⁽²²⁾.

Enteroparásitos: para la colecta de estos parásitos (que más comúnmente se encuentran en la última porción del intestino delgado y en el intestino grueso), se utiliza una pipeta. Se colocan los especímenes en cápsulas de Petri con solución fisiológica. Es recomendable que antes de la fijación, una muestra de ellos, se observe al microscopio óptico con una gota de solución de Ringer o con la misma solución fisiológica ya que, de ese modo, por el movimiento, se aprecia mejor la disposición de las hileras de cilios⁽²²⁾.

Fijación: Un método rápido para morfología de rutina es realizar un frotis con, por ejemplo, mucosa intestinal, deslizándolo en un porta o cubreobjetos y fijándolo en una cápsula de Petri con alcohol 70%. Para ello, se coloca el porta o cubreobjeto con tejido hacia abajo en la cápsula de Petri lo que ayudará a que la mayoría de los protozoos se adhieran al vidrio. Aunque también puede utilizarse formaldehído para la fijación de protozoos entéricos (en una concentración de 2,5% o 4%), éste, al igual que el alcohol 70% no resulta ser un buen fijador. El mejor fijador para protozoos es el líquido de Schaudinn (ver **Anexo II**); se procede a fijar el frotis durante 15-60 min. en el mencionado líquido y luego se lo transfiere directamente a alcohol 70%.

Helmintos:

Monogeos: los monogeos adultos, se encuentran en la vejiga urinaria de los anfibios. En este caso, se abre el órgano con una tijera o pinza y se colectan los monogeos con un pincel o pinza de punta fina, colocándolos luego en una cápsula de Petri con solución fisiológica.

Digeneos: las metacercarias pueden hallarse adheridas a la pared interna del cuerpo, a ambos lados de la columna vertebral, a los mesenterios o a la pared externa de órganos huecos. De allí, se las extrae con pinzas de punta fina y se las coloca en solución fisiológica. Algunas, como las del género *Strigea* presentan la pared del quiste muy gruesa, con diferentes capas y son muy difíciles de romper, por lo que, además de agujas de disección, quizás sea necesario el uso de pinzas de punta fina; otras, como las del género *Travtrema* presentan la pared del quiste muy fina y suelen romperse fácilmente, incluso, cuando se realiza una pequeña presión con el cubreobjetos. Las metacercarias de los géneros *Bursotrema* o *Lophosicyadiplostomum* que se localizan preferentemente en los riñones de los anfibios, son metacercarias que no forman quiste por lo que, directamente, serán colectadas y fijadas. En el caso de las metacercarias halladas en riñones, deben provocarse roturas en el tejido renal para que las mismas queden libres.

Los digeneos adultos se encuentran en órganos huecos como pulmones, intestino delgado y grueso, y vejiga urinaria. Se los extrae de cada órgano con pinzas de punta fina, pincel o pipeta y se los coloca en una cápsula de Petri con solución fisiológica antes de su fijación.

Cestodes: las larvas de cestodes pueden hallarse libres o encapsuladas en la cavidad del cuerpo, adheridas a los mesenterios, al hígado o la musculatura. En general, son larvas tetratirideas del género *Mesocestoides*. Se los extrae de su sitio de infección con pinzas de punta fina.

Los cestodes adultos se encuentran en la luz del intestino delgado. Es posible que, en especies de gran longitud, las últimas proglótides se desprendan y queden libres en la luz intestinal por lo que puede llevar a confusión a la hora de contabilizar los individuos existentes. Para subsanar esto, el número de individuos de cestodes que se contará como total de parásitos, será el número de escólices que se colecten.

Nematodes: en estado larval pueden ser hallados dentro de quistes en la mucosa del estómago (ej. *Spiroxys*, *Brevimulticaecum*) o bien, nematodes larvales no enquistados y que se encuentran adheridos a la misma por un collar cefálico (ej. *Physaloptera*). En el primer caso, al igual que con las metacercarias, es conveniente realizar dibujos y mediciones previamente a la rotura del quiste antes de proceder a su fijación. Las larvas de nematodes enquistadas también pueden ser halladas en el tejido hepático. En este caso, debe romperse el tejido por medio de pinzas y aislar la larva (ej. *Contraecum*, *Porrocaecum*); estas larvas tienen un tamaño considerable y los quistes son más difíciles de romper. En general, no presentan forma circular como los hallados en la pared estomacal sino más bien formas ovoides o no definidas.

Un apartado especial merece el tratamiento de las microfilarias, formas larvales halladas en sangre. Estas formas conservan la cutícula de las mudas producidas luego del huevo ser eliminado por la hembra (los adultos de los filarídeos se encuentran generalmente en la cavidad del cuerpo). Al igual que los protozoos sanguíneos se obtienen de una punción cardíaca. Se pueden observar fácilmente ya que se mueven activamente en preparados de sangre fresca⁽²²⁾.

En estado adulto, los nematodos pueden ser hallados en órganos huecos como pulmones, intestino delgado, intestino grueso, vesícula biliar. Cabe aclarar aquí, que existen especies de nematodos en donde el macho presenta un tamaño mucho menor que el de la hembra por lo que es necesario realizar una observación detenida del contenido del órgano con el mayor aumento del microscopio estereoscópico.

Acantocéfalos: los acantocéfalos larvales (cistacantos) se encuentran en la pared de órganos como estómago e intestino delgado, pero también pueden encontrarse en mesenterios. Dentro del quiste, el individuo presenta su probóscide invaginada. Como algunos de los principales caracteres taxonómicos se encuentran justamente en la probóscide, esta debe estar totalmente extendida para su estudio. Para lograrlo, se coloca el quiste en agua destilada fría o a temperatura ambiente y se lo deja morir (aproximadamente 48 horas) monitoreándolo bajo la lupa. A medida que el agua ingresa en el acantocéfalo por ósmosis, la presión interna aumenta y el individuo evierte su probóscide.

El mismo resultado se obtiene si se deja reposar el quiste en heladera por un período de 24 horas ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) en solución fisiológica. Cualesquiera de estos dos métodos presentan dificultad para ser realizados en el campo, por lo que se sugiere tratar de romper el quiste como en el caso del resto de los helmintos que se encuentran enquistados. La rotura del quiste puede realizarse con la utilización de agujas de disección y pinzas de punta fina.

En el caso de los acantocéfalos adultos debe tenerse especial cuidado al momento de ser extraídos ya que, en estos, la probóscide (con ganchos) se encuentra inmersa en la pared intestinal por lo que, para removerlos y no romper esos ganchos hay que ser extremadamente cuidadosos. Una forma con la cual se obtienen buenos resultados es cortar una porción del tejido que rodea la probóscide y separar luego el acantocéfalo con la ayuda de agujas de disección.

A tener en cuenta: en este punto es necesario aclarar que los parásitos hallados en un hospedador deben ser conservados en eppendorf separados según el órgano donde han sido colectados. Es decir, de un solo hospedador, al

final del examen parasitológico se contarán tantos eppendorfs como órganos parasitados se hayan encontrado en el examen. Esto es importante ya que los parásitos, generalmente, ocupan un sitio específico en el hospedador y, colocar todos los parásitos en el mismo recipiente llevaría a una confusión. Además, para estudios ecológicos, es necesario contar con el número exacto de especímenes por especie y por órgano parasitado.

Fijación: se fijan de igual manera que los helmintos larvales (metacercarias), utilizando formaldehído caliente al 10% o alcohol 70%. La fijación de los cestodos debe ser inmediata debido a que su tegumento se descompone rápidamente.

Anélidos:

Oligoquetos: este grupo de invertebrados se encuentran ocupando los uréteres de los anfibios por lo que, para su colecta, deben examinarse estos túbulos y extraer a los individuos mediante pinzas o pinceles. Una vez extraídos, se los coloca en una cápsula de Petri con solución fisiológica para luego proceder a la fijación.

Fijación: se fijan en formaldehído al 5-10% o en otros fijadores histológicos como Bouin⁽¹⁸⁾. En este último caso se calienta el líquido de Bouin y se coloca al ejemplar, que previamente se ha dispuesto entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Luego, los oligoquetos pueden conservarse en alcohol 70%^(18,72).

Artrópodos:

Pentastómidos: en los anfibios, los pentastómidos se encuentran dentro de los pulmones. Se los colecta con pinzas de punta fina. Debido a su naturaleza, estos individuos no se rompen fácilmente, pero, de todas maneras, es importante recordar que estructuras esclerotizadas como ganchos y espículas copuladoras serán necesarias para su identificación.

Fijación: son colocados en eppendorf con alcohol 70% a temperatura ambiente^(73,74).

1. b- Renacuajos:

1.b.a. Estudio de los parásitos hallados sobre la superficie del cuerpo:

Sobre la superficie del cuerpo de los renacuajos, al estar en el ambiente acuá-

tico, es posible hallar los siguientes grupos de parásitos:

- Helmintos: metacercarias enquistadas debajo de la piel.
- Anélidos: sanguijuelas adheridas por su ventosa anterior.
- Artrópodos: crustáceos copépodos que se adhieren por sus maxilípedos al cuerpo de los renacuajos.

Al igual que en los anfibios adultos se realiza un examen macroscópico de la superficie externa del anfibio y luego, un examen más minucioso del individuo bajo microscopio estereoscópico.

Extracción y fijación:

Helmintos:

Metacercarias: para la extracción y fijación se procede de igual manera que en los anfibios adultos.

Anélidos:

Sanguijuelas: se procede de igual manera que en los anfibios adultos.

Artrópodos:

Copépodos del género Lernaea: si bien es un parásito de ciprínidos, también ha sido hallado parasitando a anfibios, generalmente en la zona cercana a la cloaca. Los ejemplares se retiran cuidadosamente de los tejidos del hospedador con la ayuda de agujas y bisturíes.

Fijación: se colocan en alcohol 96%^(62,75).

1.b.b. Estudio de los parásitos hallados dentro del cuerpo:

En los anfibios en estado de renacuajo pueden hallarse internamente:

- Helmintos: monogéneos larvales (oncomiracidios) en las branquias; metacercarias enquistadas en la cavidad del cuerpo y la musculatura de la cola; nematodos adultos y, más raramente, digéneos adultos, ambos en el intestino.

En los renacuajos, del mismo modo que en los adultos, se procede al examen de la cavidad del cuerpo; para ello, se realiza una incisión ventral desde la boca hasta la cloaca y se retiran, en una cápsula de Petri con solución fisioló-

gica, los órganos del anfibio.

Extracción y fijación:

Helmintos:

Monogeneos: las larvas de monogeneos se ubican en las branquias de los renacuajos. Las branquias deben retirarse del cuerpo del renacuajo y observarse detenidamente bajo microscopio estereoscópico. La presencia de monogeneos se evidenciará por el movimiento de los mismos. Los especímenes deben desprenderse cuidadosamente del filamento branquial y colocarse en cápsulas de Petri que contengan agua del medio en donde se encontraban los renacuajos. Para el estudio de su morfología, algunos ejemplares deben estudiarse *in vivo* (lo que no siempre puede realizarse en el campo por no contar con microscopio óptico)⁽²⁰⁾.

Digeneos: las metacercarias son generalistas en cuanto a ubicación en el cuerpo de los renacuajos; pueden presentarse en la cavidad celómica o en distintos órganos (de acuerdo al estadio del renacuajo), como así también, en la musculatura de la cola. Los digeneos adultos son raramente hallados en renacuajos; cuando están presentes se ubican en el intestino de los mismos.

Nematodes: los nematodes hallados en renacuajos pertenecen al género *Gyrinicola* (Orden Oxyurida). En este género el dimorfismo sexual es marcado y el macho presenta un tamaño sumamente pequeño por lo cual, en renacuajos con alto contenido de algas filamentosas su visualización se encuentra dificultada.

Fijación: se procede de igual manera que en el caso de los helmintos hallados en anfibios adultos. En el caso de los nematodes se los fija con formaldehído al 10%; las metacercarias y los monogeneos larvales pueden fijarse con formaldehído al 5%, o bien, con alcohol 70%. En todos los casos deben ser previamente calentados. En el caso de los monogeneos larvales, puede usarse también una solución de picrato-amonio y glicerina (proporción 3:1) como fijador ya que este medio deshace las partes blandas del espécimen conservando solamente las esclerosadas (importantes para el estudio taxonómico). Para ello se coloca el ejemplar en un portaobjeto con unas gotas de la solución y luego se sella el preparado con bálsamo o barniz de uñas transparente⁽²⁰⁾.

Debido a su extensión, el intestino de los renacuajos debe examinarse por segmentos; la longitud de cada segmento dependerá del contenido que posea el individuo; a mayor cantidad de contenido intestinal, segmentos más cortos.

Posteriormente, al igual que los helmintos hallados en anfibios adultos se los conserva en los respectivos eppendorf rotulados para continuar su estudio

en el laboratorio.

2. En el laboratorio

Equipamiento: a partir del momento en que se dispone de los parásitos en el laboratorio, el instrumental necesario para su estudio será todo aquel relacionado principalmente con la coloración, aclaramiento y montaje de los mismos (líquidos colorantes, instrumentos de vidrio, diafanizadores, bálsamo de Canadá, etc.), y para el estudio propiamente dicho de los ejemplares lo cual se realiza con microscopio óptico con ocular micrométrico y cámara clara.

En esta instancia y con el objetivo de facilitar la observación de estructuras para su posterior determinación, a los parásitos hallados se les realiza tratamientos siguiendo técnicas convencionales para cada grupo taxonómico. Algunos, como los platelmintos, deben ser coloreados con hematoxilinas o algún preparado de ácido carmínico; en otros, se realizan tratamientos para su estudio histológico (el caso de especímenes enquistados en órganos determinados). Previamente, es necesario lavar los ejemplares eliminando todo el fijador, para lo que se realizan varios cambios de alcohol 70%.

A continuación, se detallan las técnicas de laboratorio comúnmente empleadas, según el grupo de parásitos. Algunos manuales de microscopia y protocolos de estudio de helmintos presentan las fórmulas de las soluciones utilizadas^(20,76). En el **Anexo II** se encuentra el detalle de las empleadas en esta sección.

Protozoos:

Hemoparásitos: se tiñen mediante la técnica May-Grünwald Giemsa (ver **Anexo II**). Para ello, el frotis realizado mediante la técnica descrita con anterioridad, una vez seco, se cubre con una mancha de colorante sobre una rejilla de tinción y se deja allí durante 20-40 minutos. Luego, se enjuaga suavemente con agua corriente y se deja secar nuevamente en posición vertical⁽²²⁾.

A tener en cuenta: los frotis deben ser observados con mayor aumento (40x) y los preparados de sangre con objetivos de inmersión (100x) para la detección de parásitos intracelulares⁽⁵¹⁾.

Enteroparásitos: la muestra previamente fijada se enjuaga con agua de grifo por varios minutos; luego se le coloca mordiente de alumbre de hierro al 4% y se lo enjuaga nuevamente. Posteriormente, se tiñe con hematoxilina de Heidenhain al 0,5% durante toda la noche (aquí el preparado se volverá com-

pletamente negro). Para eliminar el exceso de hematoxilina utilizar alumbre de hierro; aquí comienzan a diferenciarse las estructuras y esta diferenciación deberá ser controlada a través de microscopio. Finalmente, enjuagar con agua corriente al menos por dos horas y luego, deshidratar a través de una serie de alcoholes (70%, 96%, absoluto), aclarar con xileno y montar en bálsamo. Si bien estos pasos pueden llegar a ser complejos, el resultado es que nos proveen de material fijado permanentemente, que facilita su uso (ya que los parásitos están montados) y economiza lugar^(22,51).

Helmintos:

Monogeneos: para la observación de sus estructuras esclerotizadas, tales como hamuli y ganchos, estos se montan en medios como Gray y Wess u Hoyer, que permiten el montaje rápido de especímenes sin colorear. El procedimiento consiste en colocar una pequeña gota de agua en un portaobjetos, transferir el monogeneo, remover el exceso de agua con papel de filtro y reemplazar por medio de montaje. Cubrir luego con el cubreobjetos y llevar a estufa por 24 horas. Para colorear los especímenes, se utiliza el Tricrómico de Gomori (ver **Anexo II**) y se montan en bálsamo de Canadá.

Digeneos y cestodes: estos platelmintos se comprimen ligeramente entre cubreobjetos y portaobjetos y se sumergen en alcohol 96% por aproximadamente 24 horas antes de la coloración. Esto se realiza, sobre todo, con especímenes de mayor tamaño como los digeneos de los géneros *Haematoloechus* y *Gorgoderina*.

El siguiente paso consiste en la coloración. Entre los colorantes comúnmente utilizados se encuentran las hematoxilinas y el Carmín clorhídrico diluido en alcohol 96% (ver **Anexo II**).

A tener en cuenta: si los ejemplares aún se conservaban en el formaldehído fijador, antes de iniciar la coloración deben ser lavados (al menos 2 veces con alcohol 70%). Los mejores resultados en cuanto a la tinción de especímenes se obtienen sobretiñéndolos y luego diferenciándolos (decolorándolos poco a poco), hasta alcanzar el color deseado.

Cuando se colorea con Carmín, el tiempo de tinción es variable y depende del tamaño del ejemplar. El proceso requiere el pasaje de los ejemplares a través de recipientes (cápsulas o placas de Petri) con la ayuda de un pincel fino, lo ideal es trabajar con uno o dos ejemplares por muestra. Luego de la coloración, los ejemplares se diferencian con un pasaje por clorhidrato de etanol con el objetivo de eliminar el exceso de tinte, y se deshidratan mediante un

pasaje por una serie alcohólica creciente (alcohol 70%, alcohol 80%, alcohol 90%, alcohol absoluto). En cada serie de alcohol deben permanecer aproximadamente 15 minutos. La **Figura 4.9.3** esquematiza un tren de tinción para carmín clorhídrico.

Luego de la deshidratación, los individuos son diafanizados en xilol, creosota de la Haya o en eugenol. Para ello, se colocan los individuos en una cápsula conteniendo el diafanizador por un período de tiempo variable.

A tener en cuenta: los tiempos de permanencia en cada paso del proceso pueden variar, ya que dependen por ejemplo del fijador utilizado, la especie de helminto, del tamaño de los ejemplares, del tiempo que tenían los mismos en el conservante, entre otros factores.

Es importante subrayar que, si bien la creosota es un buen diafanizador, se sugiere no utilizarla por su acción cancerígena.

El último paso consiste en montar los especímenes en bálsamo de Canadá natural en preparaciones permanentes que son secadas en estufa. El tiempo de secado puede variar entre 2 y 15 días dependiendo del tamaño del ejemplar y se recomienda monitorear aproximadamente cada dos días y retirar cuando el preparado se encuentre completamente seco. El bálsamo de Canadá es un medio resinoso que da durabilidad al preparado y además proporciona mayor transparencia, incrementando su índice de refracción⁽²⁰⁾.

Los estadios larvales de digeneos son tratados de forma similar a los adultos.

Nematodes: para su tratamiento en el laboratorio los nematodos no se colorean, en cambio son diafanizados en lactofenol de Amman o en alcohol glicerinado (ver **Anexo II**) para facilitar la observación de estructuras internas. Luego se los estudia como preparaciones húmedas transitorias (**Figura 4.9.4**). Este proceso consiste en colocar una gota de diafanizador en un portaobjetos, colocar en la gota al ejemplar y luego un cubreobjetos por encima. En algunos casos, para observar estructuras importantes para la taxonomía de los nematodos (por ejemplo, la ubicación de las papilas labiales y cefálicas) es necesario realizar un preparado de la región anterior en vista apical. Para ello, con la ayuda de un bisturí u hoja de afeitar se corta transversalmente el extremo anterior del individuo y se prosigue con la preparación habitual teniendo en cuenta que en el preparado en cuestión la región oral debe quedar hacia arriba (*in face view*)⁽⁷⁷⁾.

Acantocéfalos: los especímenes de gran tamaño, que no pueden ser montados entre porta y cubreobjetos, se tratan en forma similar a los nematodos, realizándose preparados transitorios en alcohol glicerinado para observar sus

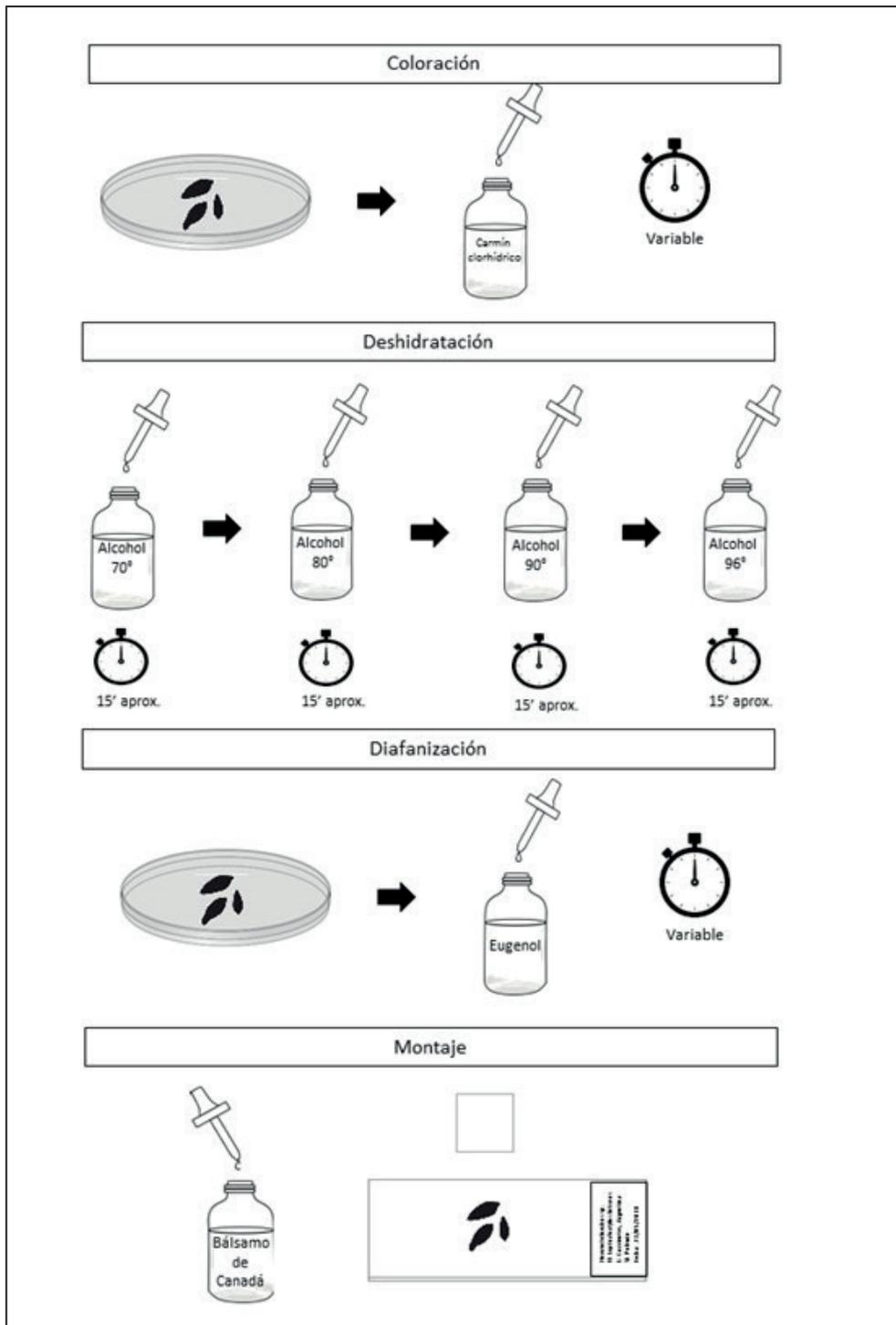


Figura 4.9.3. Pasos para la coloración de Platelminfos y Acantocéfalos y su posterior montaje (para detalles ver el texto).

estructuras internas. Los especímenes de menor tamaño pueden colorearse con Hematoxilina de Mayer o Carmín clorhídrico en forma similar a la utilizada para platelmintos.

A tener en cuenta: para la tinción y procesamiento de helmintos, los mejores resultados se obtienen si se realizan inmediatamente después de la recolección y fijación. Todos los cambios de fluidos durante el proceso de coloración deben realizarse utilizando pipetas Pasteur limpias y para evitar su hidratación con la humedad del ambiente, los frascos o cápsulas con soluciones no deben permanecer abiertos más del tiempo absolutamente necesario. Además, es importante que en ningún momento los individuos queden “en seco” durante el procesamiento; no deben dejarse al aire.

La **Tabla 4.9.1** muestra un resumen de los pasos que deben seguirse para el estudio de los helmintos, desde la fijación hasta la conservación de cada uno de los grupos, según el estadio en el que fue hallado.

Anélidos:

Oligoquetos: para el estudio de estos organismos pueden realizarse preparados transitorios con alcohol glicerinado. En lo posible, se trata de que los especímenes queden situados lateralmente para de esta forma poder observar las quetas tanto dorsales como ventrales. Si se tratase de especímenes maduros (se observa la presencia de clitelo) no será posible determinarlos sin examinar la genitalia. Para ello, se sigue un protocolo de tinción que involucra un colorante, como por ejemplo el carmín clorhídrico, y un medio de montaje que puede ser bálsamo de Canadá. Siempre con la precaución de que los especímenes queden ubicados en posición lateral⁽¹⁸⁾.

Hirudíneos: las sanguijuelas se colorean para finalmente montarse como preparados permanentes. El colorante utilizado en este proceso puede ser el paracarmín de Mayer, Carmín Borax o hematoxilina de Hams por 12-94 horas. Para diferenciarlas, se las coloca luego en una solución de etanol 1% HCl-70% hasta que la epidermis de la sanguijuela quede libre de colorante y luego se neutraliza en una solución de 1% NH₄OH — 70% de etanol. La eosina se usa habitualmente como contratinción. Los especímenes teñidos deben deshidratarse en concentraciones progresivamente más altas de etanol, aclararse en salicilato de metilo, y montarse en un medio de pH neutro⁽¹⁹⁾. Para detalle de las soluciones ver el **Anexo II**.

Artrópodos:

Ácaros y dípteros: como preparación para su identificación taxonómica, los ácaros y estados inmaduros de dípteros se aclaran en lactofenol de Amann, luego se los lava en agua corriente y se montan entre portaobjetos y cubreobjetos utilizando medio de Berlese modificado, siendo Hoyer o Faure los

	DIGENEOS	CESTODES	NEMATODES	ACANTOCÉFALOS
Fijación	<p>Estados larvales</p> <p>- Metarercarias enquistadas: formaldehído 4% o alcohol 70% caliente.</p> <p>Deben desenquistarse previamente mediante la utilización de pinzas y agujas histológicas.</p> <p>- Metarercarias libres: formaldehído 4% caliente.</p>	<p>- Larvas enquistadas: formaldehído 10% o alcohol 70% caliente.</p>	<p>- Larvas enquistadas: formaldehído 10% o alcohol 70% caliente</p>	<p>- Cistacantos: formaldehído 10% caliente o alcohol 70% caliente</p> <p>Deben desenquistarse previamente mediante refrigeración en heladera por 24 horas.</p>
Estados adultos	Formaldehído 10% o alcohol 70% caliente.	Formaldehído 4%-10% caliente (inmediata).	Formaldehído 10% o alcohol 70% caliente	Formaldehído 10% o alcohol 70% caliente
Coloración	Sí - Carmín clorhídrico	Sí - Carmín clorhídrico	No	Sí - Carmín clorhídrico o Hematoxilina de Mayer
Aclaramiento	Xilol o eugenol	Eugenol	Lactofenol de Amann o alcohol glicerinado	Eugenol
Conservación	Preparados permanentes	Preparados permanentes	Eppendorf con alcohol 70%	Preparados permanentes

Tabla 4.9.1. Fijación, coloración, aclaramiento y conservación para los principales grupos de helmintos hallados en anfibios.

más utilizados (ver **Anexo II**). Algunos ácaros que presentan poca queratinización no se aclaran, luego de fijados directamente se montan en el medio. El período de aclarado puede extenderse aproximadamente entre 1 y 15 días a temperatura ambiente. Una vez montados, es conveniente su secado en estufa a 50 °C⁽⁷⁸⁾.

Las larvas de garrapatas, por su parte, se limpian en una solución acuosa de hidróxido de potasio al 20% y se montan en medio de Hoyer como preparados semipermanentes, que serán luego estudiados mediante microscopía óptica⁽⁵⁶⁾.

Pentastómidos: los pentastómidos se limpian primero con una solución de ácido láctico al 85% y se realiza una observación mediante microscopía óptica; también pueden aclararse con líquido de Hoyer. Se diseccionan luego para la extracción de las estructuras esclerotizadas (ganchos, fulcro, espículas copuladoras) que serán montadas entre porta y cubreobjetos en la misma solución con el fin de medir y fotografiar⁽¹⁰⁾.

A tener en cuenta: el medio de Hoyer es muy tóxico y se debe tener cuidado cuando se usa. Evitar el contacto con la piel, utilizar guantes siempre que sea posible o lavarse las manos inmediatamente después de su utilización.

Observación al Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Para estudios de ultraestructuras se realizan observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido. Las técnicas utilizadas para la preparación de los organismos pueden sufrir alguna modificación que dependerá del grupo con el que se quiera trabajar. En general, una vez limpios, los especímenes se deshidratan en una serie de alcoholes y acetonas y son secados por el método de punto crítico con CO₂. Las muestras luego se montan en una lámina metálica de cobre o aluminio con cinta bifaz y posteriormente se los metaliza con un baño de oropaladio u oro para finalmente observarse y fotografiarse en vacío^(30,79).

Medidas, fotografías y dibujos

Por lo general y por su pequeño tamaño, las medidas de los especímenes se dan en micras (µm), salvo otra indicación; y son tomadas con ayuda de un ocular micrométrico en un microscopio óptico, o bien sobre dibujos realizados con la cámara clara (**Figura 4.9.4**). La cámara clara es un elemento indispensable en el estudio de los parásitos. Este accesorio nos permite una recreación exacta de la muestra que observamos ya que conserva las proporciones y medidas originales. Una de las características importantes de la cámara clara es que permite realizar dibujos en distintos planos (moviendo

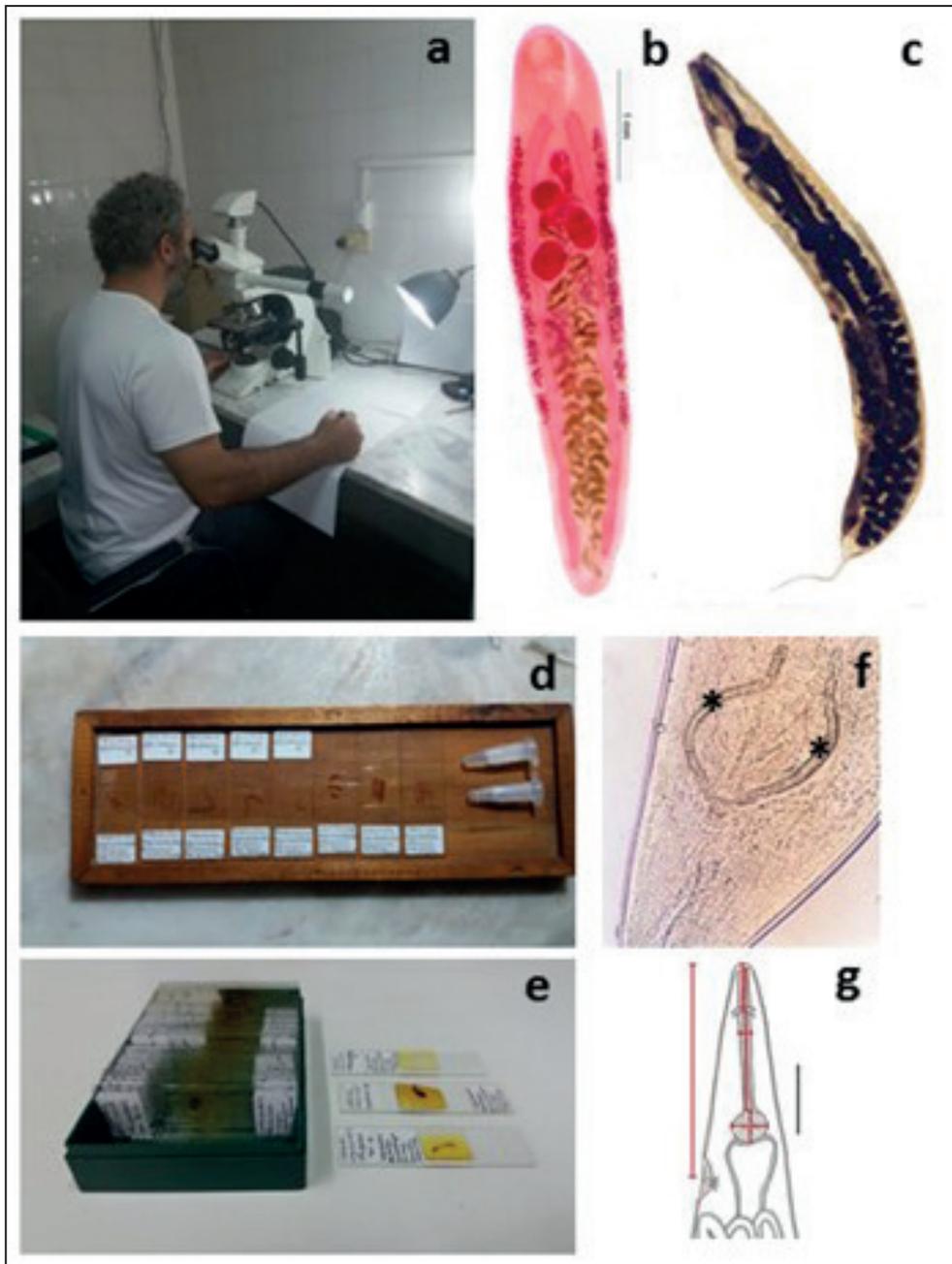


Figura 4.9.4. Estudio de los helmintos parásitos en anfibios. (a) Dibujo de los ejemplares mediante el uso de cámara clara. (b) Ejemplar de digeneo adulto coloreado con carmín clorhídrico. (c) Ejemplar hembra de nematode sin colorear. (d) Ejemplares de helmintos en sus respectivos medios de conservación; platelmintos y acantocéfalos montados en portaobjetos con bálsamo de Canadá con sus respectivas etiquetas a la izquierda de la plancha; ejemplares de nematodos con sus respectivas etiquetas en eppendorf con líquido conservante a la derecha de la plancha. (e) Ejemplares de platelmintos y acantocéfalos listos para ser guardados en sus respectivas cajas de portaobjetos. (f) Extremidad posterior de un nematode macho tratado con lactofenol de Amann. (g) Extremidad anterior de un nematode señalando las principales características morfométricas que se registran en la extremidad anterior de los mismos. Fotos: a, c-g: C. E. González; b: M. I. Hamann

* espículas

el micrométrico) los que luego podrán unirse para presentar un dibujo completo del ejemplar. Las microfotografías son tomadas con cámaras oculares en microscopios ópticos.

Identificación de los parásitos

Para la identificación de los protozoos hemáticos pueden consultarse trabajos recientes, principalmente realizados en Brasil, que tienen en cuenta tanto da-

tos morfológicos como moleculares⁽⁸⁰⁻⁸²⁾; para la identificación de protozoos entéricos se cuenta con trabajos realizados asimismo en anfibios neotropicales^(83,84). Para Argentina específicamente, pueden consultarse investigaciones realizadas tanto en anfibios larvales como adultos⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾. Si bien estos trabajos no son estrictamente claves de identificación, proporcionan información que puede ser de ayuda para determinar especies o familias.

En cuanto a helmintos, pueden consultarse para el grupo de los monogéneos, catálogos de especies de Sudamérica que proporcionan asimismo figuras detalladas y lista de hospedadores⁽⁸⁵⁾, trabajos en relación a su filogenia y clasificación^(86,87), como así también trabajos que describen especies a partir de hospedadores de Argentina⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾. Para el resto de los grupos de helmintos existen claves clásicas de identificación para digeneos⁽⁹¹⁻⁹⁵⁾, cestodos⁽⁹⁶⁾, nematodos⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾ y acantocéfalos^(100,101). Para la identificación de metacercarias pueden consultarse estudios descriptivos de estos estadios hallados en anfibios argentinos^(58,102).

Para los anélidos, pueden utilizarse diferentes guías para identificar oligoquetos acuáticos^(103,104) o trabajos más específicos dentro de este grupo, como por ejemplo para la familia Naididae⁽¹⁰⁵⁾. Para las sanguijuelas, en Argentina se cuenta con algunas revisiones para ambientes dulceacuícolas⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾, aunque también pueden consultarse trabajos referidos a su diversidad Neotropical⁽¹⁰⁹⁾ y global⁽¹¹⁰⁾.

Finalmente, para artrópodos, existen trabajos de revisión muy completos y que abarcan diagnosis, distribución, ecología e importancia sanitaria tanto de garrapatas⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾ como de ácaros⁽¹¹⁴⁾. En cuanto a los pentastómidos se cuenta con trabajos recientes que abarcan la diversidad de este grupo en distintos grupos de vertebrados⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾.

Bibliografía

1. Hoff, G.L.; Frye, F.L. & Jacobson, E.R. 1984. Diseases of Amphibians and Reptiles. Plenum Press. Nueva York.
2. Densmore, C.L. & Green, D.E. 2007. Diseases of Amphibians. *ILAR Journal* 48: 235-254.
3. Koprivnikar, J.; Marcogliese, D.J.; Rohr, J.R.; Orlofske, S.A.; Raffel, T.R. & Johnson, P.T.J. 2012. Macroparasite Infections of Amphibians: What Can They Tell Us? *EcoHealth* 9: 342-360.
4. Pough, F.H.; Andrews, R.M.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H.; Wells, K.D. & Brandley, M.C. 2015. Diets, Foraging, and Interactions with Parasites and Predators: 501-530. *En: Pough, F.H.; Andrews, R.M.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H.; Wells, K.D. & Brandley, M.C. (eds.). Herpetology. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.*
5. Blaustein, A.R.; Han, B.A.; Relyea, R.A.; Johnson, P.T.; Buck, J.C.; Gervasi, S.S. & Kats, L.B. 2011. The complexity of amphibian population declines: Understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of New York Academy of Sciences* 1223: 108-119.
6. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Basso, A.; Curi, L.; Martinuzzi, C.; Agostini, G.; Ghirardi, R.; López, J.A.; Kacoliris, F.; Martino, A.; Natale, G.S.; Arellano,

- M.L.; Úbeda, C.; Vaira, M. & Akmentins, M.S. 2018. Componente 3. Amenazas: 31-35. *En: Vaira, M.; Akmentins, M.S. & Lavilla, E.O. (eds.). Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios de la República Argentina. Cuadernos de Herpetología* 32 (supl. 1).
7. Aho, J.M. 1990. Helminth Communities of Amphibians and Reptiles: Comparative Approaches to Understanding Patterns and Processes: 157-196. *En: Esch, G.W.; Bush, A.O. & Aho, J.M. (eds.). Parasite Communities: Patterns and Processes.* Chapman & Hall. London.
 8. Price, P.W. 1990. Host Populations as Resources Defining Parasite Community Organization: 21-40. *En: Esch, G.; Bush, A. & Aho, J. (eds.). Parasite Communities: Patterns and Processes.* Chapman and Hall. New York.
 9. Poulin, R. & Morand, S. 2004. Parasite Biodiversity. Smithsonian Books. Washington.
 10. Pritchard, M.H. & Kruse, G.O.W. 1982. The Collection and Preservation of Animal Parasites. University of Nebraska Press. Lincoln.
 11. Amato, J.F.R. 1985. Manual de Técnicas para a Preparação de Coleções Zoológicas. 8. Platelminhos (Temnocefálicos, Trematódeos, Cestóides, Cestodários) e Acanthocefalos. Sociedade Brasileira de Zoologia, São Paulo.
 12. Ash, L.R. & Orihel, T.C. 1991. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. ASCP Press. Chicago.
 13. Lamothe Argumedo, R. 1997. Manual de Técnicas para Preparar y Estudiar los Parásitos de Animales Silvestres. AGT Editor. México D.F.
 14. 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* 11: 341-351.
 15. Sepúlveda, M.S. & Kinsella, J.M. 2013. Helminth collection and identification from wildlife. *Journal of Visualized Experiment* 82: e51000.
 16. Mohr, J.L. 1981. Methods for Staining Protozoans in Blood, Macrophages or Body Fluids: 281-309. *En: Baltimore, C.G. (ed.). Staining Procedures.* Philadelphia.
 17. Sonenshine, D.E. 1991. Biology of Ticks. Volumen 2, Oxford University Press. New York, Oxford.
 18. Pinder, A. 2010. Tools for identifying selected Australian aquatic oligochaetes (Clitellata: Annelida). *Museum Victoria Science Reports* 13: 1-26.
 19. Govedich, F.R. & Moser, W.E. 2015. Clitellata: Hirudinida and Acanthobdellida. *En: Thorp J. & Rogers, D.C. (eds.). Ecology and General Biology: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates.* Academic Press, London.
 20. Salgado-Maldonado, G. 2009. Manual de Prácticas de Parasitología con Énfasis en Helminthos Parásitos de Peces de Agua Dulce y otros Animales Silvestres de México. Disponible en: http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/s/salgado/manual/manual_prac_parasitol.pdf. Último acceso: 27 de agosto de 2019.
 21. Amato, J.F.R. & Amato, S.B. 2010. Técnicas Gerais para Coleta e Preparação de Helminthos Endoparasitos de Aves: 367-394. *En: Von Matter, S.; Costa Straube, F.; Almeida Accordi, I.; Queiroz Piacentini, V. & Cândido Jr., J.F. (eds.). Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento.* Technical Books Editora. Rio de Janeiro.
 22. Smyth, J.P. & Smyth, M.M. 1980. Frogs as Host-Parasite Systems I. An introduction to Parasitology through the Parasites of *Rana temporaria*, *R. esculenta* and *R. pipiens*. The Macmillan Press Ltd. London.
 23. Goater, T.M. & Goater, C.P. 2001. Ecological Monitoring and Assessment Network (EMAN). Protocols for Measuring Biodiversity: Parasites of Amphibians and Reptiles. Canada. http://eqb-dqe.cciw.ca/eman/ecotools/protocols/terrestrial/herp_parasites/intro.htm.
 24. von Hagens, G.; Tiedemann, K. & Kriz, W. 1987. The current potential of plastination. *Anatomy and Embryology* 175: 411-421.
 25. González, M.; Ortiz, J.; Navarro, M. & Latorre, R. 2018. Preservation of macroparasite species via classic plastination: an evaluation. *Folia Parasitologica* 65: 019.
 26. Halton, D. 2004. Microscopy and the Helminth parasite. *Micron* 35: 361-390.
 27. Allison, V.; Ubelaker, J.; Webster Jr., R. & Riddle, J. 1972. Preparations of Helminths for scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology* 58: 414-416.
 28. Hirschmann, H. 1983. Scanning Electron Microscopy as a Tool in Nematode Taxonomy: 95-111. *En: Stone, A.; Platt, H. & Khalil, L. (eds.). Concepts in Nematode Systematics.* Academic Press. Nueva York.

29. Gibbons, L.M. 1986. SEM Guide to the Morphology of Nematode Parasites of Vertebrates. CAB International, Wallingford.
30. González, C.E.; Hamann, M.I. & Salgado, C. 2012. Study of Helminth Parasites of Amphibians by Scanning Electron Microscopy: 267-294. *En: Kazmiruk V. (ed.). The Scanning Electron Microscope. InTech Open Acces, Rijeka.*
31. Tavares, R.G.; Staggemeier, R.; Borges, A.L.P.; Rodrigues, M.T.; Castelan, L.A.; Vasconcelos, J.; Anschau, M.E. & Spalding, S.M. 2011. Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 17: 239-248.
32. Martin, D.S.; Wright, A.-D.G.; Barta, J.R. & Desser, S.S. 2002. Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes, *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveuilemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. *Journal of Parasitology* 88: 566-571.
33. Tkach, V. & Pawlowski, J. 1999. A new method of DNA extraction from the ethanol-fixed parasitic worms. *Acta Parasitologica* 44: 147-148.
34. Yoder, M.; De Ley, I.T.; King, I.W.; Mundo-Ocampo, M.; Mann, J.; Blaxter, M.; Poiras, L. & De Ley, P. 2006. DESS: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology* 8: 367-376.
35. 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.
36. Mangold, A.J.; Bargues, M.D. & Mas-Coma, S. 1998a. 18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 84: 31-37.
37. Mangold, A.J.; Bargues, M.D. & Mas-Coma, S. 1998b. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 84: 478-484.
38. Huggins, L.G.; Michaels, C.J.; Cruickshank, S.M.; Preziosi, R.F. & Else, K.J. 2017. A novel copro-diagnostic molecular method for qualitative detection and identification of parasitic nematodes in amphibians and reptiles. *PLoS ONE* 12: e0185151.
39. Johnson, P.T.J.; Lunde, K.B.; Thurman, E.M.; Ritchie, E.G.; Wray, S.N.; Sutherland, D.R.; Kapfer, J.M.; Frest, T.J.; Bowerman, J. & Blaustein, A.R. 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs* 72: 151-168.
40. Johnson, P.T.J. & Lunde, K.B. 2005. Parasite Infection and Limb Malformations: A Growing Problem in Amphibian Conservation: 124-138. *En: Lannoo, M.J. (ed.). Amphibian Declines: The Conservation Status of United States Species. University of California Press. Berkeley.*
41. Rajakaruna, R.S.; Piyatissa, P.; Jayawardena, U.A., Navaratne, A.N. & Amerasinghe, P.H. 2008. Trematode infection induced malformations in the common hourglass treefrogs. *Journal of Zoology* 275: 89-95
42. Jayawardena, U.A.; Rajakaruna, R.S.; Navaratne, A.N. & Amerasinghe, P.H. 2010. Monostome cercariae induced malformations in amphibians: effect of infection at the pre-limb-bud stage tadpoles of *Polypedates cruciger* Blyth. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 38: 241-248.
43. Davies, D.; Davies, C.; Lauthier, J.J.; Hamann, M. & De Núñez, M.O. 2015. Morphological and ITS2 molecular characterization of *Ribeiroia* cercariae (Digenea: Psilostomidae) from *Biomphalaria* spp. (Gastropoda: Planorbidae) in Northern Argentina. *Journal of Parasitology* 101: 549-555.
44. Drago, F.B.; Lunaschi, L.I. & Schenone, M. 2011. Digenean parasites of the Neotropical Cormorant, *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin, 1789) (Aves: Phalacrocoracidae) from Argentina: Distribution extension and new host records. *Check List* 7: 871-875.
45. Lunaschi, L. & Drago, F. 2007. Checklist of digenean parasites of amphibians and reptiles from Argentina. *Zootaxa* 1476: 51-68.
46. González, C.E. & Hamann, M.I. 2015. Checklist of nematode parasites of amphibians from Argentina. *Zootaxa* 3980: 451-476.
47. Hernández-Orts, J.S.; Kuchta, R.; Semenas, L.; Crespo, E.A.; González, R.A. & Aznar, F.J. 2015. An annotated list of the Acanthocephala from Argentina. *Zootaxa* 4663: 1-64.
48. Mazza, S.; González, C.; Franke, I. & Alvarado, S. 1927. Tripanosomas observados en ranas (*Leptodactylus ocellatus* L.) del país. *Revista Universidad de Buenos Aires* 5: 902- 905.

49. Vucetich, M. & Giacobbe, O. 1949. Polimorfismo del *Trypanosoma rotatorium*. Nuevos batracios argentinos parasitados. *Universidad Nacional de Tucumán, Anales del Instituto Médico Regional* 2: 225-244.
50. Cabagna Zenklusen, M.C.; Peltzer, P.M.; Attademo, A.M. & Lajmanovich, R.C. 2006. Hallazgo de *Giardia agilis* (Protozoa: Diplomonadida), parásito de larvas de *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae) en agroecosistemas de la provincia de Entre Ríos, Argentina. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 17: 106-108.
51. Cabagna Zenklusen, M.C.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M. & Attademo, A.M. 2009. Primeros registros de endoparásitos en cinco especies de anfibios anuros del litoral argentino. *Cuadernos de Herpetología* 23: 33-40.
52. Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Junges, C.; Bassó, A. & Cabagna-Zenklusen, M. 2012. Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Anura) inhabiting selected soybean and rice agroecosystems of Argentina. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43: 579-584.
53. Quinzio, S. & Goldberg, J. 2015. Intradermal infections by chigger mites (*Hannemania* spp.) in the Andean frog *Telmatobius atacamensis* (Anura, Telmatobiidae). *Salamandra* 51: 263-268.
54. García, G.; Mangione, S. & Montenegro, R. 2018. Infestation with intradermal and subhypodermic larvae of the mite *Hannemania* sp. (Acari: Leeuwenhoekidae) in anurans of the Province of Salta, Argentina. *Revista Argentina de Parasitología* 7: 17-22.
55. González Rivas, C.J.; Castillo, G.N.; Acosta, J.C.; Venzal, J.M. & Guglielmone, A.A. 2012. Primer reporte de parasitismo de una garrapata blanda del género *Ornithodoros* (Ixodida: Argasidae) sobre *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en el departamento de Valle Fértil, San Juan, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26: 95-97.
56. Venzal, J.M.; Castillo, G.N.; Gonzalez-Rivas, C.J.; Mangold, A.J. & Nava, S. 2019. Description of *Ornithodoros montensis* n. sp. (Acari, Ixodida: Argasidae), a parasite of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura: Bufonidae) in the Monte Desert of Argentina. *Experimental and Applied Acarology* 78:133-147.
57. González, C.E. & Hamann, M.I. 2005. *Gyrinicola chabaudi* Araujo & Artigas, 1982 (Nematoda: Pharyngodonidae) in tadpoles of *Scinax nasicus* (Cope, 1862) (Anura: Hylidae) from Corrientes, Argentina. *Facena* 21: 145-148.
58. Hamann, M.I. & González, C.E. 2009. Larval digenetic trematodes in tadpoles of six amphibian species from Northeastern Argentina. *Journal of Parasitology* 95: 623-628.
59. Castillo, G.N.; Ramallo, G.; Bursey, C.R.; Goldberg, S.R. & Acosta, J.C. 2017. *Pseudis plantensis*. Endoparasites. *Herpetological Review* 48: 611-612.
60. Villegas-Ojeda, M.A. & Tanzola, R.D. 2019. Ensamblajes de helmintos parásitos en larvas de *Boana pulchella* (Anura, Hylidae) en un arroyo serrano del Sudoeste bonaerense (Argentina). *Revista Argentina de Parasitología* 8: 15-24.
61. Salinas, Z.A.; Biolé, F.G.; Grenat, P.R.; Pollo, F.E.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2016. First report of *Lernaea cyprinacea* (Copepoda: Lernaecidae) in tadpoles and newly metamorphosed frogs in wild populations of *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae) in Argentina. *Phyllo-medusa* 15: 43-50.
62. Salinas, Z.A.; Babini, M.S.; Grenat, P.R.; Biolé, F.G.; Martino, A.L. & Salas, N.E. 2019. Effect of parasitism of *Lernaea cyprinacea* on tadpoles of the invasive species *Lithobates catesbeianus*. *Heliyon* 5: e01834.
63. Fox, S.F.; Greer, A.L.; Torres-Cervantes, R. & Collins, J.P. 2006. First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases Aquatic Organisms* 72: 87-92.
64. Vaira, M.; Akmentins, M.; Attademo, M.; Baldo, D.; Barrasso, D.; Barrionuevo, S.; Basoo, N.; Blotto, B.; Cairo, S.; Cajade, R.; Céspedes, J.; Corbalán, V.; Chilote, P.; Duré, M.; Falcione, C.; Ferraro, D.; Gutierrez, R.; Ingaramo, M.; Junges, C.; Lajmanovich, R.; Lescano, J.; Marangoni, F.; Martinazzo, L.; Marti, R.; Moreno, L.; Natale, G.; Pérez Iglesias, J.; Peltzer, P.; Quiroga, L.; Rosset, S.; Sanabria, E.; Sanchez, L.; Schaefer, E.; Úbeda, C. & Zaracho, V. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26: 131-159.
65. International Union for Conservation of Nature. 2020. The IUCN's Red List of Threatened Species. Version 2017-3, IUCN. Último acceso: 21 de abril de 2020.
66. Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on

- identification. *Herpetology* 16: 183-190.
67. Frey, J.K.; Yates, T.L.; Duszynski, D.W.; Gannon, L. & Gardenr, S.L. 1992. Designation and curatorial management of type host specimens (symbiotypes) for new parasite species. *Journal of Parasitology* 78: 930-932.
 68. Brooks, D.R. 1993. Extending the Symbiotype Concept to Host Voucher Specimens. *Journal of Parasitology* 79: 631-633.
 69. Mulieri, P.R.; Schaefer, E.F.; Duré, M.I. & González, C.E. 2018. A new flesh fly species (Diptera: Sarcophagidae) parasitic on leptodactylid frogs. *Parasitology Research* 117: 809-818.
 70. Oyarzún-Ruiz, P. & González-Acuña, D. 2020. Colecta, preparación e identificación de parásitos. *Parasitología Latinoamericana* 69: 12-29.
 71. Woo, P.T.K. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology* 47: 921-923.
 72. Brinkhurst, R.O. 1986. Guide to the freshwater aquatic microdrile oligochaetes of North America. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 84: 1-259.
 73. Barton, D.P. & Riley, J. 2004. *Raillietiella indica* (Pentastomida) from the lungs of the Giant Toad, *Bufo marinus* (Amphibia), in Hawaii, U.S.A. *Comparative Parasitology* 71: 251-254.
 74. Barton, D.P. 2007. Pentastomid parasites of the introduced Asian House Gecko, *Hemidactylus frenatus* (Gekkonidae), in Australia. *Comparative Parasitology* 74: 254-259.
 75. Waicheim, M.A.; Arbetman, M.; Rauque, C. & Viozzi, G. 2019. The invasive parasitic copepod *Lernaea cyprinacea*: updated host-list and distribution, molecular identification and infection rates in Patagonia. *Aquatic Invasions* 14: 350-364.
 76. Langeron, M. 1942. Précis de Microscopie. Masson et Cie, Paris.
 77. Anderson, R. C. 1958. Methode pour l'examen des nématodes en vue apicale. *Annals de Parasitologie Humaine et Comparée* 34: 171-172.
 78. Zhang, Z.-Q. 2003. Mites of Greenhouses: Identification, Biology and Control. CABI Publishing, Wallingford.
 79. Corwin, D., Clifford, C.M. & Keirans, J.E. 1979. An improved method for cleaning and preparing ticks for examination with the scanning electron microscope. *Journal of Medical Entomology* 16: 352-353.
 80. Ferreira, R.C.; Campaner, M.; Viola, L.B.; Takata, C.S.A.; Takeda, G.F. & Teixeira, M.M.G. 2007. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology* 134: 1623-1638.
 81. Lemos, M.; Morais, D.H.; Carvalho, V.T. & D'Agosto M. 2008. First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Parasitology* 94: 148-151.
 82. Leal, D.D.M.; O'Dwyer, L.H.; Ribeiro, V.C.; Silva, R.J.; Ferreira, V.L. & Rodrigues, R.B. 2009. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in Anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States — Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81: 199-206.
 83. Delvinquier, B.L.J. & Marinkelle, C.J. 1996. Opalinidae (Slopalinida) in South American Amphibia. Genus *Opalina* Purkinje & Valentin, 1835 in Colombia. *Systematic Parasitology* 34: 27-35.
 84. Delvinquier, B.L.J. & Marinkelle, C.J. 1997. Opalinidae (Slopalinida) in South American Amphibia. Genus *Zelleriella* Metcalf, 1920 in Colombia. *Systematic Parasitology* 38: 93-110.
 85. Cohen, S.C.; Justo, M.C.N. & Kohn, A. 2013. South American Monogeneoidea parasites of fishes, amphibians and reptiles. Editorial Oficina de Livros, Rio de Janeiro.
 86. Boeger, W.A. & Kritski, D.C. 1993. Phylogeny and a revised classification of the Monogeneoidea Bychowsky, 1937 (Platyhelminthes). *Systematic Parasitology* 26: 1-32.
 87. Olson, P.D. & Littlewood, D.T.J. 2002. Phylogenetics of the Monogenea—evidence from a medley of molecules. *International Journal for Parasitology* 32: 233-244.
 88. Combes, C. & Laurent, R.F. 1974. *Polystoma borellii* n. sp. (Monogenea, Polystomatidae) parasite de *Pleurodema borellii* (Anura, Leptodactylidae) en République Argentine. *Acta Zoológica Lilloana* 31: 57-94.
 89. Combes, C. & Laurent, R.F. 1978. Deux nouveaux Polystomatidae (Monogenea) de République Argentine. *Acta Zoológica Lilloana* 32: 85-91.
 90. Combes, C. & Laurent, R.F. 1979. Les Monogènes Polystomatidae de République Argentine: description de deux nouvelles espèces et essai de synthèse. *Revista Ibérica de Parasitología* 79: 545-557.

91. Yamaguti, S. 1958. *Systema Heminthum*. Vol.1. The digenetic trematodes of vertebrate. Interscience, New York.
92. Yamaguti, S. 1975. A Synoptical Review of Life Histories of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Kyoto, Japan.
93. Gibson, D.I.; Jones, A. & Bray, R.A. 2002. Keys to the Trematoda. Vol. 1. CABI Publishing y The Natural History Museum, Wallingford.
94. Jones, A.; Bray, R.A. & Gibson, D.I. 2005. Keys to the Trematoda. Vol. 2. CABI Publishing and The Natural History Museum, Londres.
95. Bray, R.A.; Gibson, D.I. & Jones, A. 2008. Keys to the Trematoda. Vol. 3. CABI Publishing and The Natural History Museum, Londres.
96. Khalil, L.F.; Jones, A. & Bray, R.A. 1994. Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates. CAB International, Wallingford.
97. Yamaguti, S. 1961. *Systema Heminthum*. Vol. 3. The Nematodes of Vertebrate. Interscience New York. Supplementary Volume, CAB International, Wallingford.
98. Anderson, R.C.; Chabaud, A.G. & Willmontt, S. 2009. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Archival Volume. CAB International, Wallingford, Oxford.
99. Gibbons, L.M. 2010. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Supplementary Volume, CAB International, Wallingford, Wallingford.
100. Yamaguti, S. 1963. *Systema Heminthum*. Vol. 5. The Acantocephala of Vertebrates. I. Interscience New York.
101. Amin, O.A. 2013. Classification of the Acanthocephala. *Folia Parasitologica* 60: 273-305.
102. Hamann, M.I.; Fernández, M.V. & González, C.E. 2019. Metacercariae of Strigeidae parasitizing Amphibians of the Chaco region in Argentina. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 91: e20180044.
103. Brinkhurst, R.O. & Jamieson, B.G.M. 1971. Aquatic Oligochaeta of the World. Oliver and Boyd, Edimburgo.
104. Brinkhurst, R.O. & Marchese, M.R. 1992. Guía para la Identificación de Oligoquetos Acuáticos Continentales de Sud y Centroamérica. Colección Climax, Santo Tomé.
105. Harman, W.J. 1980. Specific and Generic Criteria in Freshwater Oligochaeta, with Special Emphasis on Naididae: 1-8. *En: Brinkhurst, R.O. & Cook, D.G. (eds.). Aquatic Oligochaeta Biology*. Springer US, Boston.
106. Ringuelet, R.A. 1944. Revisión de los Hirudíneos argentinos de los géneros *Helobdella*, *Batrachobdella*, *Cylicobdella* y *Semiscolex*. *Revista del Museo de La Plata Nueva Serie. Zoología* 4: 5-94.
107. Ringuelet, R.A. 1985. Fauna de Agua Dulce de la República de Argentina. Hirudinea, FECIC, Buenos Aires, Argentina.
108. Gullo, B.S. 2014. Biodiversidad de Hirudinea en ambientes dulceacuícolas serranos (Provincia de Buenos Aires), Argentina. *Revista del Museo de La Plata Sección Zoología* 23: 1-11.
109. Christoffersen, M. L. 2009. A catalogue of *Helobdella* (Annelida, Clitellata, Hirudinea, Glossiphoniidae), with a summary of leech Diversity from South America. *Neotropical Biology and Conservation* 4: 89-98.
110. Sket, B. & Trontelj, P. 2008. Global diversity of leech. *Hydrobiologia* 595: 129-137.
111. Kohls, G.M.; Sonenshine, D.E. & Clifford, C.M. 1965. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). II. Identification of the larvae of the western hemisphere and descriptions of three new species. *Annals Entomological Society of America* 58: 331-364.
112. Estrada-Peña, A.; Mangold, A.J.; Nava, S.; Venzal, J.M & Labruna, M. 2010. A review of the systematics of the tick family Argasidae (Ixodida). *Acarologia* 50: 317-333.
113. Nava, S.; Venzal, J.M.; Acuña, D.G.; Martins, T.F. & Guglielmone, A.A. 2017. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. Academic Press. London.
114. Krantz, G.W. & Walter, D.E. 2009. A Manual of Acarology. Texas Tech University Press, Lubbock.
115. Christoffersen, M.L. & De Assis, J.E. 2013. A systematic monograph of the Recent Pentastomida, with a compilation of their hosts. *Zoologische Mededelingen* 87: 1-206.
116. Paré, J.A. 2008. An overview of pentastomiasis in reptiles and other vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* 17: 285-294.
117. Poore, G.C.B. 2012. The nomenclature of the Recent Pentastomida (Crustacea), with a list of species and available names. *Systematic Parasitology* 82: 211-240.

ANEXO I

	Número de Protocolo:
HOSPEDADOR:	
LUGAR:	COORDENADAS:
FECHA:	PESO:
LONGITUD:	SEXO:
ESTADIO DE GOSNER:	
Método de eutanasia:	
A- SUPERFICIE EXTERNA DEL CUERPO:	
B- EXAMEN INTERNO:	
Cavidad del cuerpo:	
Musculatura:	
Mesenterios:	
Cerebro:	
Zona faríngea:	
Pulmones:	
Estómago:	
Intestino delgado:	
Intestino grueso:	
Vesícula biliar:	
Riñones:	
Cloaca:	
OBSERVACIONES:	

ANEXO II

Fijadores más usados:	Colorantes más usados:
<p>* <i>Formaldehído al 10%</i> Formaldehído al 40%: 10 partes Agua destilada: 90 partes</p> <p>* <i>Formaldehído al 5%</i> (para metacercarias) Formaldehído al 40%: 5 partes Agua destilada: 95 partes</p> <p>* <i>Alcohol 70%</i></p> <p>* <i>A.F.A.</i> Etanol 95%: 50 partes Formaldehído 40%: 6 partes Ácido acético glacial: 4 partes Agua destilada: 40 partes</p> <p>* <i>Fleming</i> Ácido crómico al 1%: 15 partes Ácido ósmico al 2%: 4 partes Ácido acético glacial: 1 parte</p> <p>* <i>Bouin</i> Solución saturada de ácido pícrico: 15 partes Formaldehído 40%: 5 partes Ácido acético: 1 parte</p> <p>* <i>Líquido de Schaudinn</i> (cloruro de mercurio saturado) Cloruro de mercurio: 100ml Etanol absoluto: 50ml Ácido acético glacial: 7,5ml</p>	<p>* <i>May-Grünwald Giemsa</i> Glicerol: 40ml Alcohol metílico: 65ml Giemsa en polvo: 1g Se diluye en solución buffer 3:97</p> <p>* <i>Carmín Clorhídrico</i> Carmín: 5ml Ácido clorhídrico: 5ml Agua destilada: 5ml Alcohol 90%: 200ml</p> <p>* <i>Tricómico de Gomori</i> Cromotropo 2R: 0,6g Fast green FCF, Light green o Anilina blue: 0,3g Ácido fosfotúngstico: 0,8g Ácido acético glacial: 1ml Agua destilada: 100ml</p> <p>* <i>Hematoxilina de Mayer</i> Agua destilada: 1000ml Sulfato aluminico potásico o sulfato aluminico de amonio: 50g Hematoxilina cristalizada: 1g Yodato de sodio: 0,2g Ácido cítrico: 1g Hidrato de cloral: 50g</p> <p>* <i>Hematoxilina de Heidenhain</i> Hematoxilina cristalina: 0,5g Alcohol 96%: 10ml Agua destilada: 90ml</p>

<p>Diferenciadores: * Etanol 70°GL — Clorhídrico 0,5% Etanol 70°: 199 ml Ácido clorhídrico: 1 ml</p> <p>Diafanizadores: * Xilol * Creosota de Haya * Eugenol * Lactofenol de Amann Fenol derretido (ácido carbólico): 3 partes Ácido láctico: 1 parte Glicerina pura: 2 partes</p> <p>* Alcohol glicerinado Alcohol 70%: 90 partes Glicerol: 10 partes</p>	<p>Medios de montaje: * Bálsamo de Canadá</p> <p>* Berlese modificado: H₂O destilada: 50ml Hidrato de cloral: 50g Glicerol: 20ml Goma arábica: 30g</p> <p>* Hoyer Hidrato de Cloral: 100g Goma arábica en cristales: 15g Glicerina: 10ml Agua destilada: 25ml</p> <p>* Gray y Wess Alcohol polivinílico (PVA 71-24) en polvo: 2g Acetona 70%: 7ml Glicerina: 5ml Ácido láctico: 5ml Agua destilada: 10 ml</p>
--	---