

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

GABRIELA RIBEIRO DA SILVA

**INFECÇÃO POR *Streptococcus agalactiae* EM RÃS TOURO (*Lithobates catesbeianus*)
CULTIVADAS EM SISTEMA INUNDADO**

Uberlândia
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

GABRIELA RIBEIRO DA SILVA

**INFECÇÃO POR *Streptococcus agalactiae* EM RÃS TOURO (*Lithobates catesbeianus*)
CULTIVADAS EM SISTEMA INUNDADO**

Trabalho apresentado para conclusão de
Residência em Medicina Veterinária
Preventiva, sob orientação do Prof. Dr.
Frederico Augusto de Alcântara Costa.

Uberlândia
2020

INFEÇÃO POR *Streptococcus agalactiae* EM RÃS TOURO (*Lithobates catesbeianus*) CULTIVADAS EM SISTEMA INUNDADO.

Gabriela Ribeiro da Silva¹; Frederico Augusto de Alcântara Costa²

1- Médica Veterinária Residente em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, Brasil. E-mail: gabirs.05@gmail.com

2- Professor (a) Doutor (a) em Aqüicultura, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, Brasil.

RESUMO

A ranicultura assim como toda atividade de produção animal, gera produtos de interesse comercial. A produção de rãs de cultivo gera principalmente, a carne de rã, produto conhecido mundialmente por suas propriedades nutricionais, como proteínas de alto valor biológico, baixo teor de gordura, boa concentração de minerais e hipoalergenicidade. Além da carne, os subprodutos da produção de rãs touro (*Lithobates catesbeianus*) como a carne mecanicamente separada, também tem ganhado destaque comercial. Bactérias do gênero *Streptococcus spp.* são consideradas patógenos de relevância para a aquicultura mundial. Este trabalho objetivou identificar a causa de mortalidade massiva, em sistema intensivo alagado de criação de rãs touro. Os principais sinais clínicos apresentados pelos animais foram natação errática, anorexia, edema abdominal e de membros, opacidade de córnea e curvatura lateral do corpo, levando à suspeita clínica de estreptococose. Foram coletados 13 animais durante o período de janeiro a junho de 2019 que apresentavam sinais clínicos da doença. Após avaliação macroscópica dos órgãos durante necropsia, foram coletadas de forma asséptica, amostras do cérebro, coração, fígado, pulmão e líquidos ascítico. Foram obtidos 26 isolados dos quais 42,30% de cérebro, 23,07% de coração, 15,38% de fígado, 11,53% de pulmão e 7,69% de líquidos ascítico. Todos os isolados foram caracterizados como cocos Gram positivos, catalase e oxidase negativos. Essas amostras foram analisadas pela técnica de MALDI-TOF e identificadas como *Streptococcus agalactiae*. Bactérias do gênero *Streptococcus spp.* podem ser encontradas na microbiota natural da pele de rãs de cultivo, podendo ser patogênicos em situações favoráveis, como em sistemas de criação com alta densidade de estocagem. O patógeno *Streptococcus agalactiae*, é comum em peixes, sendo responsável por altas taxas de mortalidade em sistemas de criação intensiva. Esse é o primeiro relato de *Streptococcus agalactiae* descrito em rãs-touro, causando mortalidade e prejuízos econômicos.

Palavras- chave: Patógeno; Estreptococose; Mortalidade.

Streptococcus agalactiae INFECTION IN BULLFROGS (*Lithobates catesbeianus*) CULTIVATED IN A FLOODED SYSTEM.

ABSTRACT

Raniculture, like all animal production activities, generates products of commercial interest. The production of cultivated frogs mainly generates frog meat, a product known worldwide for its nutritional properties, such as proteins of high biological value, low fat content, good concentration of minerals and hypoallergenicity. In addition to meat, by-products from the production of bull frogs (*Lithobates catesbeianus*) such as mechanically separated meat, have also gained commercial prominence. Bacteria of the genus *Streptococcus spp.* are considered

important pathogens to aquaculture worldwide. The aim of this study were identify the cause of massive mortality, in a flooded intensive system of breeding bull frogs. The main clinical signs presented by the animals were erratic swimming, anorexia, abdominal and limb edema, corneal opacity and lateral curvature of the body, leading to the clinical suspicion of streptococcosis. Thirteen animals were collected during the period from January to June 2019 that showed clinical signs of the disease. After macroscopic evaluation of the organs during necropsy, samples of the brain, heart, liver, lung and ascitic liquids were collected aseptically. 26 isolates were obtained, of which 42.30% brain, 23.07% heart, 15.38% liver, 11.53% lung and 7.69% ascitic fluid. All isolates were characterized as Gram positive cocci, catalase and oxidase negative. These samples were analyzed using the MALDI-TOF technique and identified as *Streptococcus agalactiae* Bacteria of the genus *Streptococcus* spp. can be found in the natural microbiota from the skin of cultivated frogs, and can be pathogenic in favorable situations, such as in rearing systems with high stocking density. The pathogen *Streptococcus agalactiae*, is common in fish, being responsible for high mortality rates in intensive farming systems. This is the first report of *Streptococcus agalactiae* described in bullfrogs, causing mortality and economic losses.

Key words: Pathogen; Streptococcosis; Mortality

1. Introdução

A ranicultura brasileira teve início na década de 1930, quando o canadense Tom Cyril Harrysson trouxe para o Brasil, 300 casais de rãs-touro americana (*Lithobates catesbeianus*), espécie nativa da América do Norte, dando início ao primeiro ranário comercial do país, localizado no estado do Rio de Janeiro (FERREIRA *et al.*, 2002).

A escolha desta espécie foi atribuída a inúmeras qualidades favoráveis à produção, como a fácil adaptação a sazonalidade climática do país, precocidade, fecundidade e prolificidade (CARRARO, 2016; ANTONUCCI, 2009).

A carne de rã destaca-se como uma fonte nobre de pescado, e seu consumo vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos. Além de ser considerada nutricionalmente rica em proteínas, a carne de rã também possui baixa taxa de gorduras, sendo indicada, principalmente para dietas hipocalóricas (CRIBB *et al.*, 2013).

De acordo Cribb *et al.* (2013), diferentemente da maioria dos países que praticam a caça ou cultivo extensivo de rãs, no Brasil institui-se a criação dos animais em cativeiro, a partir de sistemas inicialmente rudimentares, que com o decorrer dos anos e de parcerias com instituições de pesquisas, foram se desenvolvendo e tornando-se mais tecnificados.

Dentre estes sistemas, o sistema inundado, descrito por Mazzoni *et al.* (1995), representa hoje uma forte tendência entre os ranicultores do país. Isto porque objetiva trabalhar com altas densidades de animais, apresentando-se totalmente repleto de água (0,05 m), com ausência de cochos e abrigos. Em contrapartida, como desvantagem, este sistema favorece a proliferação de microorganismos (patogênicos ou não), causando altas taxas de mortalidade no plantel, e consequentemente, grandes perdas econômicas para o produtor.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar o patógeno responsável por altas taxas de mortalidade de rãs touro, criadas em sistema inundado na Fazenda Experimental do Glória, município de Uberlândia, Minas Gerais, durante o período de janeiro a junho de 2019.

2. Material e métodos

2.1 Coleta dos animais

Durante o ano de 2019, foi observada uma alta taxa de mortalidade de rãs touro, criadas em sistema inundado, no Setor de Aquicultura da Fazenda Experimental do Glória, da Universidade Federal de Uberlândia.

Durante as aulas práticas que acontecem no setor, foram selecionados 13 animais adultos neste período, que apresentavam sinais clínicos, com peso médio de 200 gramas.

Os treze animais selecionados passaram por avaliação macroscópica durante a necropsia, assim, associada também aos sinais clínicos manifestados pelos animais, optou-se por coletar amostras de cérebro, coração, fígado, pulmão e líquido ascítico totalizando 54 amostras coletadas, sendo uma amostra de cada órgão dos treze animais.

Os animais inicialmente manifestavam inapetência ou diminuição na ingestão de alimentos, anorexia, letargia e natação errática, lesões localizadas principalmente em região rostral da cabeça e membros, opacidade de córnea, curvatura lateral da coluna vertebral, hemorragia oral, edema de membros anteriores e/ou posteriores, e em alguns casos, ascite.

2.2 Exames físico e eutanásia

As rãs passaram por exame físico externo e após este procedimento, foram eutanasiadas, (de acordo com as recomendações da Resolução Normativa nº 29, de 13 de novembro de 2015 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), através da administração de lidocaína em gel por pincelamento no interior da boca dos animais, e em condições assépticas, foi realizada a necropsia e coleta de amostras de cérebro, fígado, coração e pulmão de cada animal, totalizando 54 amostras coletadas.

2.3 Coleta e processamento das amostras

Fragmentos de tecidos (cérebro, coração, fígado, pulmão e líquido ascítico) foram coletados em alça descartável estéril e semeados em Ágar Sangue, enriquecido com 5% de sangue de ovino desfibrinado, e incubado em estufa a 28°C por 48 horas. Após o período de incubação, as colônias isoladas, passaram pelos testes de Gram, catalase e oxidase.

Finalizada a execução dos testes fenotípicos, as colônias foram congeladas em caldo Brain Heart Infusion (BHI- Difco) acrescido de glicerol a 15%, e armazenadas em freezer a - 80°C.

Após este procedimento, fragmentos dos órgãos selecionados foram armazenados em formol tamponado a 10%, para realização de análises histológicas dos tecidos.

Posteriormente, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, e novamente semeadas em Ágar Sangue enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, e enviadas ao Laboratório AQUACEN Saúde Animal em Belo Horizonte, para identificação dos isolados, através da metodologia MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*).

2.5 MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*)

Consiste em um sistema no qual o material biológico (neste caso, colônias bacterianas em placas de Petri), é colocado em uma placa contendo uma matriz polimérica. Através de radiação a laser, ocorre vaporização da amostra e ionização de várias moléculas. Estas por sua vez, são aspiradas num tubo á vácuo e levadas a um detector. De acordo com a molécula, o tempo de chegada, conhecido como *Time of Flight*, é diferente. Estes dados são então, projetados graficamente, o que significa que para cada espécie bacteriana, existirá um gráfico diferente. A partir de uma base de dados computadorizada, é possível então, a interpretação dos resultados obtidos, fornecendo um resultado rápido e de alta acurácia (BENAGLI, 2011).

3. Resultados e discussão

A partir da Tabela 1, observa-se a relação entre a quantidade de amostras coletadas e a quantidade de amostras que foram selecionadas devido ao crescimento em Ágar Sangue, de colônias compatíveis com as do gênero *Streptococcus sp.*, devido às suas características macro e microscópicas, bem como suas respectivas porcentagens.

Tabela 1 – Relação das amostras coletadas e crescimento em Ágar Sangue.

MATERIAL	TOTAL DE AMOSTRAS EXAMINADAS	TOTAL DE AMOSTRAS ISOLADAS	% DE AMOSTRAS ISOLADAS
Cérebro	13	11	42,30%
Coração	13	06	23,07%
Fígado	13	04	15,38%
Pulmão	13	03	11,53%
Líquido ascítico	02	02	7,69%

Das 54 amostras coletadas e semeadas em Ágar Sangue, foram obtidos 26 isolados. Destes isolados 11 correspondem às amostras de cérebro, 06 às amostras de coração, 04 às amostras de fígado, 03 às amostras de pulmão e 02 às amostras de líquido ascítico.

As colônias apresentaram coloração branco acinzentada e aspecto puntiforme. No teste de Gram, foram classificadas como cocos Gram positivos e nos testes de catalase e oxidase, apresentaram resultado negativo.

Diante das características fenotípicas dos isolados bacterianos, associadas aos sinais clínicos manifestados pelos animais, indicavam que o surto de mortalidade das rãs, foi causado por bactéria do gênero *Streptococcus spp.*, patógeno relativamente comum em animais aquáticos, e que apresenta alta incidência em sistemas de criação com altas densidades de estocagem (PILARSKI, 2010). Posteriormente, no teste de MALDI-TOF, todos os isolados foram identificados como *Streptococcus agalactiae*.

Dentre as bactérias patogênicas para peixes, o *Streptococcus agalactiae* é uma das mais importantes, especialmente para Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), criadas de forma intensiva em tanques rede, pois é responsável por quadros de meningoencefalite e

septicemia aguda (EVANS *et al.*, 2002; MIAN *et al.*, 2009). Durante surtos da doença, as taxas de mortalidade podem alcançar até 90% dos animais, levando a grandes prejuízos econômicos (EVANS *et al.*, 2006; FARIA *et al.*, 2013).

Na ranicultura, as bactérias do gênero *Streptococcus spp*, também podem estar envolvidas em surtos com altas taxas de mortalidade dos animais em sistemas de criação intensiva por serem consideradas ubíquas e de ampla distribuição no ambiente aquático (MOSTÉRIO *et al.*, 2014).

A microbiota natural da pele de rãs de cultivo pode encontrar-se alterada de acordo com o ambiente em que os animais se encontram, ou seja, um aumento na quantidade de patógenos oportunistas no ambiente pode colocar em risco a saúde do hospedeiro (LOKESH, KIRAN, 2016).

Xu *et al.* (2017) afirmam que bactérias patogênicas responsáveis por causarem enfermidades às rãs de cultivo, em sua maioria, encontram-se relacionadas à fatores como a saúde do hospedeiro e também às condições de manejo sanitário do ambiente.

Em sistemas de criação como o inundado, embora possam ser citados como forte tendência entre as raniculturas comerciais, pode-se dizer que é um sistema que exige cuidados especiais, principalmente por trabalhar com alta densidade de animais. Ferreira (2002) afirma que os fatores supracitados, associados a outras condições como manejos alimentar, físico, sanitário e profilático inadequados, variações de temperatura ou luminosidade do ambiente, alterações na qualidade da água, canibalismo, presença de predadores ou competição por alimento, podem ser considerados fatores estressantes para as rãs. Tais fatores contribuem diretamente para a patogenicidade do *Streptococcus spp*. pois podem causar imunossupressão (FRANCESCHINI, 2012).

Instalações com estruturas danificadas e sujas com fezes e ração podem ser responsáveis por lesões que acabam se tornando porta de entrada para microorganismos presentes no ambiente (ZANGERÔNIMO *et al.*, 2002), vindo a tornarem-se patogênicos, pois os animais permanecem em contato com dejetos e sobras de alimentos, podendo desencadear possíveis patogenias. Em exames bacteriológicos realizados nestas lesões, já foram isoladas bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus* e fungo *Candida sp* (MELLO, 2001).

De acordo com Suhet (2011), para que a infecção bacteriana causada pelo *Streptococcus agalactiae* se instale faz-se necessário que a temperatura corporal do animal, esteja entre 27°C e 30°C, temperatura esta, bastante observada durante o período em que ocorreu o surto na ranicultura.

É possível observar, que a maior frequência de isolamento, ocorreu a partir de amostras do cérebro dos animais (43,30%). Marcusso *et al.* (2015), afirmam que, em estudo realizado sobre isolamento de *Streptococcus agalactiae* em tilápias, a maior porcentagem de isolados também ocorreu no cérebro dos mesmos. Além disso, reforçam a necessidade de estudos relacionados à presença do patógeno neste órgão.

Em relação à patogenia e achados de necropsia, embora em tilápias a infecção causada por *Streptococcus agalactiae* ainda não seja totalmente caracterizada, alterações iniciais em peixes infectados naturalmente pelo patógeno foram observadas pela associação da presença das colônias da bactéria e exotoxinas junto às lesões do cérebro, fígado, baço e rins (CHEN *et al.*, 2007; SUANYUK *et al.*, 2008).

O fato da maior presença do agente *Streptococcus agalactiae* em amostras do sistema nervoso pode ser justificado a partir do seu mecanismo de virulência. O patógeno causa necrose local, de forma que consegue invadir e se multiplicar dentro de macrófagos. Estes passam a atuar como veículo da bactéria, disseminando-a para vários órgãos, inclusive, transpondo a barreira hematoencefálica, levando a um quadro septicêmico (ELDAR *et al.*, 1994).

De acordo com Nizet (2002), por possuir uma cápsula de polissacarídeo, que é capaz de impedir a fagocitose por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro, o microorganismo consegue sobreviver no interior dos fagócitos, sendo possível sua migração para o sistema nervoso central. Jarva *et al.* (2003) afirmam que o ácido siálico presente na cápsula, é fator essencial para a patogenicidade, pois é o responsável por impedir a deposição do componente C3b do sistema complemento, o que não permite que ocorra fagocitose do microorganismo.

O fato de ter ocorrido crescimento de colônias do patógeno em amostras coletadas de órgãos como coração (23,07%), fígado (15,38%), pulmão (11,53%) e também em líquido ascítico (7,69%), corrobora com a ideia de que o *Streptococcus agalactiae*, é responsável por quadros de meningoencefalite e septicemia observados em rãs- touro, assim como acontece em peixes (PILARSKI,2010).

Macroscopicamente, foi possível observar que órgãos como o fígado e o coração encontravam-se aumentados de tamanho, além de pontos necróticos e alteração de cor, concordando com Marcusso *et al.* (2015), que afirmam que em tecidos como fígado e rim de tilápias, também foi possível o isolamento de *Streptococcus agalactiae*, reforçando a necessidade de pesquisas que elucidem a presença deste patógeno nestes órgãos, uma vez que os mesmos também encontravam-se aumentados de volume e repletos de sangue.

Leal (2011) confirma que o processo de infecção causado por *Streptococcus agalactiae* pode causar septicemias em peixes, por se manifestar em órgãos como encéfalo, rim, fígado e baço, pois estes se encontram envolvidos em funções imunológicas, além de serem bastante vascularizados.

4. Conclusão

O agente *Streptococcus agalactiae* foi responsável por causar infecção com sinais clínicos e mortalidade em rãs touro, semelhantes àqueles manifestados por peixes.

Considera-se importante o investimento em pesquisas capazes de elucidar aspectos como os mecanismos de infecção e patogenia do microorganismo, sua epidemiologia, e principalmente, métodos eficientes de prevenção como vacinas, e controle, como a investigação da eficácia de bases antimicrobianas evitando-se a adoção de medidas equivocadas de tratamento, como a administração de antibióticos ineficientes.

Referências

- ANTONUCCI, A. M. Caracterização de agentes patogênicos virais e metazoários em rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, provenientes de ranários comerciais do Vale do Paraíba no estado de São Paulo, 2009. 75f. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto de Pesca do Estado de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BENAGLI, C.; ROSSI, V.; DOLINA, M.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinically Relevant Bacteria. **PLoS ONE**, v. 6(1), 2011.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016424>
- BIE, J.; TONG, Q.; LIU, X.; ZHANG, X.; WANG, H. Comparative analysis of cutaneous bacterial communities of farmed *Rana dybowskii* after gentamycin bath. **PeerJ**, v. 8, p.1–18, 2020. <https://doi.org/10.7717/peerj.8430>
- CARRARO, K.C. **Ranicultura: um bom negócio que contribui para a saúde**. Revista da FAE, v.11, n.1, 2016.
- CHEN, C. Y.; CHAO, C. B.; BOWSER, P. R. Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* infected tilapia. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 27, n., p. 2–9, 2007.
- CRIBB, A. Y.; AFONSO, Muniz Afonso; FERREIRA, Cláudia Maris. **Manual técnico de ranicultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2013.
- ELDAR, A.; BEJERANO, Y.; LIVOFF, A.; HOROVITCZ, A.; BERCOVIER, H. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 33–40, 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00052-X](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(94)00052-X)
- FERREIRA, CLÁUDIA MARIS; PIMENTA, ANDRÉA GALVÃO CÉSAR; PAIVA NETO, JOÃO SIMÕES. **Introdução à ranicultura**. Boletim Técnico do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 33, p. 2–15, 2002.

FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D. O.; FARIA, F. C.; COSTA, G. M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p. 678–680, 2006.

FRANCESCHINI, L. **Infecções parasitárias e microbianas na produção do pacu *Piaractus mesopotamicus* e do híbrido patinga procedentes da região Noroeste do Estado de São Paulo**, 2012, 91f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

LOKESH, J.; KIRON, V. Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon. **Scientific Reports**, v. 6(1), 2016.

<https://doi.org/10.1038/srep19707>

MARCUSSO, P. F.; NETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; VIEIRA, F. C. F.; SALVADOR, S.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede, **Bioscience Journal**, v. 31, n. 2, p. 549–554, 2015.

MAZZONI, R.; CARVENIA, D.; ALTIERI, W.; MATSUMARA, Y. Cria de ranas em ‘Sistema inundado’, experiências em ranários comerciais. International Meeting on Frog Research and Technology, Encontro Nacional De Ranicultura, p. 121–122, 1995.

MELLO, S. C. 2001. Sistema inundado de criação de rãs. Ensaio experimental. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, São Paulo. 31 outubro 2001. I CICLO DE PALESTRAS SOBRE RANICULTURA DO INSTITUTO DE PESCA. ISSN 0103–1767. 2001.

MOSTÉRIO, C.M.F.; MAZZONI, R.; HIPÓLITO, M. **Principais patologias de anfíbios em criadouros comerciais**. In: MADI, R. R.; CAMPOS, C.M.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. (Org.). Patologia e Sanidade em Ambientes Aquáticos, p. 115–135, 2014.

OLIVEIRA, S. J. **Guia Bacteriológico prático: microbiologia veterinária**, Canoas: ULBRA, 2012.

PILARSKI, F.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. **Isolamento e resistência a antimicrobianos de cepas de *Streptococcus* spp. provenientes de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*)**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 62, p. 1275–1279, 2010.

SUHET, M. I. ***Streptococcus* spp. e *Aeromonas* spp. na água e em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) parâmetros físicos-químicos da água de piscicultura em tanques-redes**. 2011. 74 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

SUANYUK, N.; KANGHEAR, H.; KHONGPRADIT, R.; SUPAMATTAYA, K. *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 307–319, 2005.

ZANGERÔNIMO, M. G.; FILHO, O. P. R.; MURGAS, L. D. S. **Manejo no sistema anfigranja de criação intensiva de rãs.** Lavras - MG: UFLA, 2002 (Boletim Técnico).