

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE ASPIRAÇÃO NA COLHEITA DE CÉREBRO DE MORCEGOS PARA DIAGNÓSTICO DA RAIVA

J.F. Gonçalves*, C. Carvalho, W.A. Pedro, L.H. Queiroz

Universidade Estadual Paulista, Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793, CEP 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil. E-mail: julianogoncalves1@yahoo.com.br

RESUMO

O diagnóstico laboratorial da raiva em morcegos é realizado utilizando-se, principalmente, o cérebro do animal suspeito. O objetivo do presente trabalho foi testar a hipótese de que o método de aspiração com pipeta plástica (tipo Pasteur) é eficaz na obtenção de cérebro de morcegos para a realização do diagnóstico comparado com o método tradicional de abertura de crânio. Para tanto, estudaram-se quatro espécies diferentes de morcegos, *Molossus rufus* E. Geoffroy, 1805, *Molossus molossus* (Pallas, 1766), *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) e *Myotis nigricans* (Schinz, 1821), totalizando 200 amostras. A quantidade de cérebro obtida pelo método tradicional foi significativamente maior, contudo, o material colhido pela aspiração foi suficiente para a execução do diagnóstico da doença e não danificou nenhum dos caracteres biométricos do crânio. Ambos os métodos detectaram indivíduos positivos, sendo que o método de aspiração teve a vantagem de preservar o crânio possibilitando melhor identificação das espécies.

PALAVRAS-CHAVE: Chiroptera, raiva, diagnóstico, colheita de cérebro, preservação de crânio.

ABSTRACT

EVALUATION OF ASPIRATION METHOD FOR BAT BRAIN COLLECTION FOR RABIES DIAGNOSIS. The diagnosis of rabies in bats is usually performed using the brain of suspected animals. The main hypothesis tested by the present study was whether the aspiration method using a plastic pipette (Pasteur type) was effective in the collection of bat brain sample for rabies diagnosis when compared to the skull-opening method. A total of 200 bats of 4 species were studied: *Molossus rufus* E. Geoffroy, 1805, *Molossus molossus* (Pallas, 1766), *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) and *Myotis nigricans* (Schinz, 1821). The proportion of brain weight compared to body weight was statistically higher when using the traditional method, although the brain mass collected by the aspiration method was enough for rabies diagnosis and did not damage any skull biometric characteristics. The results demonstrate that both collection methods detected positive samples, while the aspiration method has the advantage of skull preservation, permitting the identification of the species.

KEY WORDS: Chiroptera, rabies, diagnosis, brain harvest, skull preservation.

A raiva é uma doença infecciosa aguda causada por um *Lyssavírus* que acomete todos os mamíferos, inclusive os morcegos e o homem. Sua epidemiologia é, em parte, influenciada pela distribuição, abundância, demografia, ecologia comportamental, dispersão das espécies de reservatórios, assim como pelas suas interações com os seres humanos (RUPPRECHT *et al.*, 1995).

O conhecimento de aspectos ligados à patogenia e epidemiologia da raiva nas diferentes espécies de morcegos constitui importante instrumento para o

controle da enfermidade nesses animais, bem como em herbívoros, animais de estimação e humanos (SCHEFFER *et al.*, 2007).

Embora os morcegos não-hematófagos possuam importantes funções de polinização, dispersão de sementes e predação de insetos, principalmente em regiões tropicais, deve-se evitar a sua presença nas habitações de humanos, pois o modo mais comum de transmissão da raiva é a mordedura tendo como veículo a saliva (RUPPRECHT *et al.*, 1995).

*Trabalho apresentado como Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – UNESP - Araçatuba em 26/9/2008.

Nas regiões Norte e Noroeste do Estado de São Paulo, com municípios sede em Araçatuba, Presidente Prudente e São José do Rio Preto, no período de 1997 a 2002, foram registrados 98 casos de raiva em várias espécies de morcegos em áreas urbanas e rurais. A doença ocorreu predominantemente em morcegos frugívoros, com destaque para *Artibeus lituratus*, espécie com maior número de exemplares positivos nessas regiões (CUNHA *et al.*, 2006).

No Estado de São Paulo, segundo normas do Programa Estadual de Controle da Raiva (KOTAIT *et al.*, 1998), os municípios devem recolher os morcegos suspeitos e enviá-los para diagnóstico laboratorial por meio da imunofluorescência direta (DEAN *et al.*, 1996) e de inoculação intracerebral em camundongos (KOPROWSKI, 1996). Os resultados laboratoriais, embora no caso dos morcegos não influenciem na decisão de se proceder ou não um tratamento, são importantes para o estudo da epidemiologia e para se instituir medidas de controle da doença.

Para a realização do diagnóstico da raiva, a colheita de cérebro é feita tradicionalmente por abertura de crânio, porém a utilização da pipeta plástica (tipo Pasteur) já foi citada por KING *et al.* (1998), indicando-a para situações onde não há a possibilidade da abertura do crânio, ao passo que EAST *et al.* (2001) utilizaram canudos de plástico para a coleta de amostras de cérebro de hienas mortas por acidentes, introduzindo os canudos pelo forame magno. Além disso, a utilização da pipeta plástica demonstrou-se bastante útil para a coleta de cérebro de animais silvestres de pequeno porte, destinados à pesquisa do vírus rábico, em área de preservação permanente no Município de Ribeirão Grande, SP (IAMAMOTO, 2005; IAMAMOTO *et al.*, 2009).

Quando se trata de morcegos, a abertura do crânio com a tesoura causa danos aos ossos, cujas características são importantes para a identificação da espécie, feita por meio de dados biométricos (VIZOTTO; TADDEI, 1973; GREGORIN; TADDEI, 2002; REIS *et al.*, 2007). Essa identificação, por sua vez, é importante para a sistemática filogenética, que fornece subsídios para uma compreensão geral da diversidade biológica, da evolução dos táxons e da modificação de caracteres (AMORIN, 2002), já que o método comparativo vem sendo, desde os tempos de Darwin, uma das principais maneiras de estudar os padrões e processos da evolução biológica (DINIZ FILHO, 2000).

Não foram encontradas, na literatura, pesquisas que investigaram qualquer diferença de eficácia entre esses dois métodos de colheita de cérebro. Considerando que o sucesso para a realização das técnicas depende de uma quantidade do órgão suficiente para efetuar o decalque na lâmina de imunofluorescência e para preparar o macerado, que será utilizado na prova biológica e, considerando que havia sido comprovado por meio de um treinamento prévio da técnica

de aspiração que a quantidade de cérebro colhida com a pipeta plástica foi suficiente para fazer os dois procedimentos. Entretanto, esperava-se que a possível diferença na quantidade de cérebro obtido pelas duas técnicas não interferisse no diagnóstico da raiva. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que o método de aspiração com pipeta plástica (tipo Pasteur) é eficaz na obtenção de cérebro para a realização do diagnóstico comparado com o método tradicional de abertura de crânio.

Foi utilizado no presente trabalho um total de 200 morcegos provenientes dos Municípios da região de Araçatuba, encaminhados ao Laboratório de Raiva da Universidade Estadual Paulista – Campus de Araçatuba, no período de agosto de 2005 a novembro de 2007. De cada um deles, obteve-se uma amostra de cérebro para a realização dos testes de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos, segundo recomendações da OMS (MESLIN *et al.*, 1996).

A escolha do método pelo qual o cérebro dos animais foi retirado (abertura de crânio ou a aspiração com pipeta plástica) foi feita por meio de sorteio simples visando a casualização das amostras, as quais foram pesadas, sempre pela mesma pessoa (previamente treinada no novo método durante seis meses), em uma balança eletrônica de precisão (0,01g) devidamente calibrada, anotando-se o peso corporal e, em seguida, o peso do tecido cerebral retirado.

A partir dos pesos obtidos, foi calculada e registrada para cada animal, por meio de uma regra de três, a proporção do peso cerebral em razão do peso corporal, denominada PPCRPC e dada em porcentagem. Ela foi calculada multiplicando-se por 100 o peso do cérebro retirado e dividindo-se esse resultado pelo peso integral do morcego, demonstrado na seguinte fórmula: $PC \times 100 / PM = PPCRPC$, onde PC representa o peso do cérebro retirado e PM o peso integral do morcego. Esse parâmetro tornou-se mais coerente para a comparação, uma vez que os animais recebidos não eram da mesma espécie e não apresentavam pesos iguais.

Os animais selecionados estavam em boas condições de conservação, isto é, ainda não haviam entrado em decomposição e haviam sido enviados sob refrigeração ou ainda vivos. As espécies incluídas no estudo corresponderam às aquelas recebidas com maior frequência no laboratório, ou seja, *Molossus rufus* (80 espécimes), *Molossus molossus* (60 espécimes), *Artibeus lituratus* (40 espécimes) e *Myotis nigricans* (20 espécimes), formando dois grupos para cada espécie, segundo o método utilizado, sendo que cada grupo teve a mesma quantidade de espécimes, totalizando 100 amostras para cada método, uma vez que não seria possível utilizar o mesmo cérebro para fazer os dois métodos.

Foi escolhida uma faixa de peso correspondente a 10% a mais ou a menos do que a média descrita por PEDRO (1998) para três destas espécies na idade adulta: *M. rufus*, *A. lituratus* e *M. nigricans*. Para as amostras de *M. molossus* o critério de escolha da faixa de peso foi de 40% a menos ou igual à média descrita por PEDRO (1998) para esta espécie, uma vez que os espécimes recebidos não conseguiram alcançar a faixa de peso escolhida para as outras três, por corresponderem, em sua maioria, a indivíduos jovens ou por estarem, alguns deles, em estado de desidratação.

No método de abertura de crânio, a retirada do cérebro foi feita com uma tesoura de aço inox, pequena, com ponta fina, devidamente afiada e esterilizada, cortando-se os tecidos que cobrem a cabeça e afastando-se os músculos que recobrem o crânio para uma melhor visualização do osso. Foram realizados três cortes, sendo o primeiro na região orbital (Fig. 1A) por

onde foram inseridas as pontas da tesoura. Posteriormente, foi feito nas duas laterais do crânio de modo a abrir a calota craniana (Fig. 1B). Uma vez totalmente exposto, o cérebro foi retirado com a própria tesoura e, quando necessário, com o auxílio de uma pinça anatômica para que nenhum resíduo de cérebro ficasse dentro da cavidade craniana.

No método de aspiração com pipeta plástica, a retirada foi feita por meio de uma secção na altura da articulação atlanto-occipital do morcego, pelo qual, com auxílio de uma pinça anatômica pequena, foi feita a desobstrução do forame magno (Fig. 1C), retirando-se o osso atlas. Nesse orifício, foi inserida a ponta de uma pipeta plástica de polipropileno, tipo Pasteur, de 170 mm e ponta com 3 mm de diâmetro, com capacidade de 3 mL. O cérebro foi então aspirado, executando-se, em média, quatro sucções até a obtenção de uma aspiração seca.

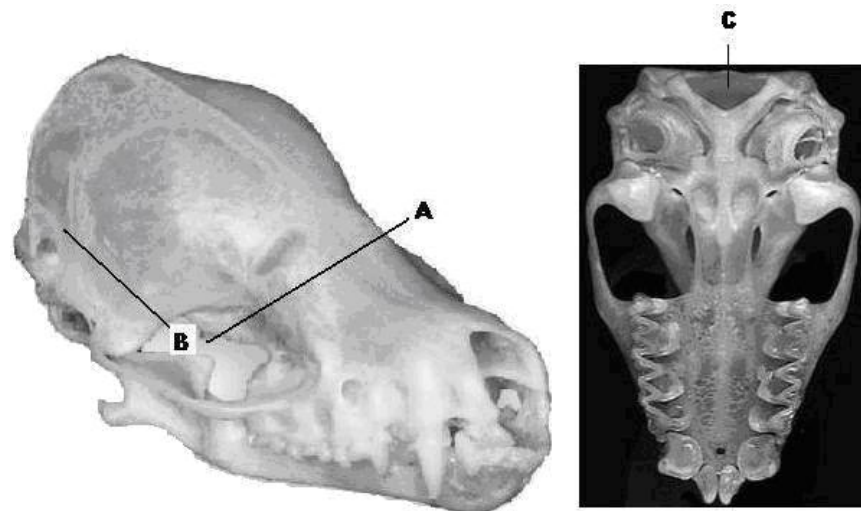


Fig. 1 - Localização das regiões craniais usadas nos métodos de abertura de crânio (AB) e de aspiração com pipeta plástica (C) para a retirada de cérebro de morcegos.

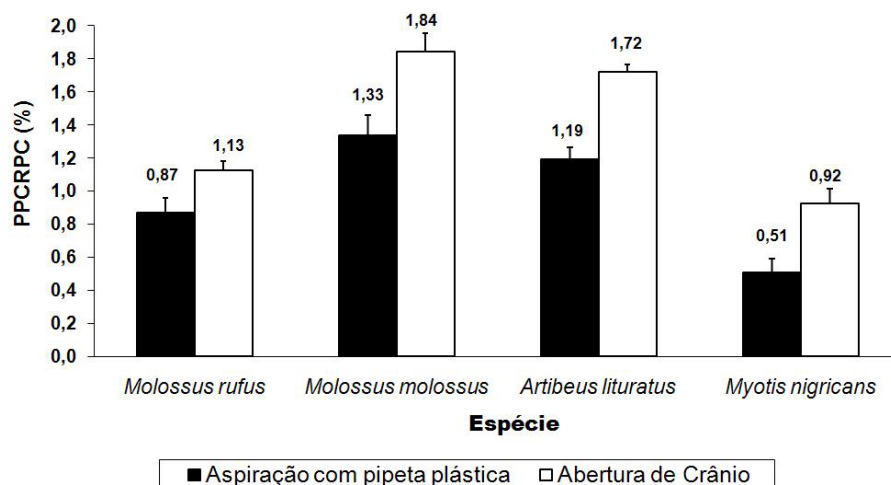


Fig. 2 - Médias e desvios da proporção do peso cerebral em razão do peso corporal (PPCRPC) obtidas por dois métodos de retirada de cérebro de espécies de morcegos, no período de 2005 a 2007. Araçatuba, SP.

Utilizou-se o teste t para a comparação das médias da PPCRPC obtidas pelos dois métodos, adotando-se o nível de significância de 5% (ZAR, 1998). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa de um programa estatístico computadorizado – Statistical Analysis System (SAS, 1999).

A diferença entre os métodos, no que se refere à quantidade de massa cerebral obtida em todas as espécies, foi estatisticamente significativa ($P < 0,0001$), conforme Figura 2.

O teste t indicou uma diferença estatística de 0,26 entre a PPCRPC no grupo dos *M. rufus*; de 0,51 no grupo dos *M. molossus*; de 0,53 no grupo dos *A. lituratus* e de 0,41 no grupo dos *M. nigricans*. Esses valores foram considerados altamente significativos na comparação das PPCRPC's. Contudo, em termos práticos, ambos foram tecnicamente similares, haja vista que em todos os morcegos estudados foi possível a colheita de material cerebral suficiente para todas as análises.

A técnica de abertura de crânio resultou em maior quantidade de cérebro, porém danificou o osso, principalmente na espécie *A. lituratus* que apresentou uma maior densidade óssea do crânio em relação às outras três espécies.

Das 200 amostras cerebrais selecionadas para análise, duas foram positivas para a raiva (1%), sendo uma delas da espécie *M. molossus* enviada pelo Centro de Controle de Zoonoses do Município de Araçatuba em abril de 2006 e obtida pelo método de aspiração com pipeta plástica, e a outra da espécie *A. lituratus*, enviada pela Secretaria de Saúde do Município de Ilha Solteira, em agosto do mesmo ano, coletada pelo método de abertura de crânio.

Adotar um procedimento que retire a massa cerebral e preserve o crânio facilita muito o processo de identificação de espécies nas áreas de sistemática filogenética e taxonomia e, embora alguns autores já tenham descrito sua utilização, não há relatos de trabalhos comparando métodos de colheita de cérebros de morcegos para o exame da raiva.

Desta forma, a metodologia empregada neste estudo facilita a realização de trabalhos de conservação ambiental nos quais há a necessidade de capturar e eutanasiar animais. Assim, um número maior de amostras poderia ser enviado para a pesquisa do vírus da raiva, sem a necessidade da remessa do animal inteiro ao laboratório. Além disso, o método da aspiração permite ainda a coleta de amostras de cérebro de animais mortos por atropelamento em estradas, sem a necessidade da coleta integral do cérebro ou envio do material inteiro.

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que o método de aspiração com pipeta plástica foi eficaz na obtenção de cérebro de morcegos para a

realização do diagnóstico da raiva comparado com o método tradicional de abertura de crânio, pois, apesar da menor quantidade obtida, esta foi suficiente para a execução dos métodos de diagnóstico.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 06/01247-6).

REFERÊNCIAS

- AMORIN, D.S. *Fundamentos da sistemática filogenética*. Ribeirão Preto: Holos, 2002. p.11-12.
- CUNHA, E.M.S.; QUEIROZ da SILVA, L.H.; LARA, M.C.C.S.H.; NASSAR, A.F.C.; ALBAS, A.; SODRÉ, M.M.; PEDRO, W.A. Raiva em morcegos na região norte-noroeste do Estado de São Paulo, Brasil: 1997-2002. *Revista de Saúde Pública*, v.40, n.6, p.1082-1086, 2006.
- DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). *Laboratory techniques in rabies*. 4.ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.88-95.
- DINIZ FILHO, J.A.F. *Métodos filogenéticos comparativos*. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.13-21.
- EAST, M.L.; HOFER, H.; COX, J.H.; WULLE, U.; WIIK, H.; PITRA, C. Regular exposure to rabies virus and lack of symptomatic disease in Serengeti spotted hyenas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, n.26, p.15026-15031, 2001.
- GREGORIN, R.; TADDEI, V.A. Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). *Mastozoología Neotropical*, v.9, n.1, p.13-32, 2002.
- IAMAMOTO, K. *Pesquisa do vírus rábico em mamíferos silvestres de uma reserva natural particular no município de Ribeirão Grande, São Paulo*. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- IAMAMOTO, K.; QUADROS, J.; QUEIROZ, L.H. Use of aspiration method for collecting brain samples for rabies diagnosis in small wild animals. *Zoonoses and Public Health*, v.56, 2009. (No prelo).
- KING, A.A. Rabies. In: PALMER, S.R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D.I.H. (Ed.). *Zoonosis*. Oxford: Oxford University Press, 1998. p.437-458.

- KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). *Laboratory techniques in rabies*. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.80-87.
- KOTAIT, I.; GONÇALVES, C.A.; PERES, N.F.; SOUZA, M.C.M.; TARGUETA, M.C. *Controle da raiva nos herbívoros*. São Paulo: Instituto Pasteur, 1998. (Manuais, 1) 15p. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/manual_01.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2008.
- MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and rabies research. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). *Laboratory techniques in rabies*. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.9-27.
- PEDRO, W.A. *Diversidade de morcegos em habitats florestais fragmentados do Brasil (Chiroptera, Mammalia)*. 1998. 128p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.
- REIS, N.R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. *Morcegos do Brasil*. Londrina: Nélío R. dos Reis, 2007. p.17-23.
- RUPPRECHT, C.E.; SMITH, J.S.; FEKADU, M.; CHILDS, J.E. The ascension of wild life rabies: a cause for public health concern or intervention? *Emerging Infections Diseases*. v.1, n.4, p.107-114, 1995.
- SAS Institute Inc., *SAS OnlineDoc*®. Version 8, Cary, NC: SAS Institute, 1999.
- SCHEFFER, K.C.; CARRIERI, M.L.; ALBAS, A.; SANTOS, H.C.P. dos; KOTAIT, I.; ITO, F.H. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.41, n.3, p.389-395, 2007.
- VIZOTTO, L.D.; TADDEI, V.A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 1973.
- ZAR, J. H. *Bioestatistical analysis*. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998.

Recebido em 16/5/08
Aceito em 12/5/09