

the decrease of dog and consequently human rabies number. The last human rabies case caused by canine rabies virus in the state of São Paulo occurred in 1997 and in 1998 the last case canine rabies. In this context the present work aimed to evaluate the effectiveness of protective vaccination of dogs from rural farms in the county of Anhembi – SP, after two years without being immunized against rabies with a vaccine campaign. During 2011 an epidemiological questionnaire was applied to 22 farms to collect data about the health of animals and hygienic handling of property. One hundred percent of dog's owners declared that their dogs only received anti-rabies vaccine during public campaign that was stopped two years before. Fifty one dogs blood samples were collected by jugular vein puncture. The blood collection tube was centrifuged and the serum stored at -20 ° C. Sera were tested for neutralization in cell culture for the determination of neutralizing antibodies to rabies virus by rapid method focus inhibition of fluorescence (RIFFT). Of the 51 analyzed dogs, 68% presented antirabies antibodies titers above 0.5 UI/ml, indicating that they are still protected but on the other hand 32% of analyzed population was detected unprotected and therefore susceptible to infection. Our results agree with literature data that indicates that rabies vaccine induce immunity longer than one two years and consider the revaccination every three years but at the same time demonstrate that a percentage of the animals don't maintain protective titers after two years indicating that the revaccination protocol must be carefully evaluated considering the epidemiological situation.

#### PT.074 I FÓRUM DE QUALIDADE E BIOSSEGURANÇA NO DIAGNÓSTICO DA RAIVA EM RECIFE: PERSPECTIVAS E MUDANÇAS DE PARADIGMA

Araujo ACR<sup>1</sup>, Machado JLM<sup>2</sup>, Ribeiro MGB<sup>3</sup>, Silva LAM<sup>4</sup>, Oliveira JCT<sup>5</sup>, Gomes ES<sup>6</sup>, Boller MAA<sup>7</sup> – <sup>1</sup>LACEN/LANAGRO-PE – DIAGNÓSTICO DE RAIVA, <sup>2</sup>LACEN/PE/ LANAGRO/PE, <sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco. Centro Acadêmico de Vitória, <sup>4</sup>Grupo de Estudos de Morcegos no Nordeste (GEMNE), <sup>5</sup>UFPE/CAV/GEMNE, <sup>6</sup>Secretaria Municipal de Saúde de São José do Egito, <sup>7</sup>Fundação Oswaldo Cruz

Diante da necessidade de elencar a situação atual do rebanho e das condições de amostras para raiva no Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco LANAGRO/PE, amostras estas, potencialmente infectantes que vem sendo expostas de modo indiscriminado em alguns casos, se fez necessária a realização do I Fórum de Qualidade e Biossegurança no Diagnóstico da Raiva, entre os dias 15 e 16 de Novembro de 2011 em Recife-PE. Este Fórum teve como objetivo promover a discussão e o debate sobre a Qualidade e a Biossegurança no diagnóstico da Raiva, destacando de modo inclusivo a coleta, acondicionamento e envio do material, visando ainda a implementação do método para a padronização e conformidades das amostras, garantindo assim a Biossegurança para os profissionais envolvidos direta e indiretamente no monitoramento e controle da Raiva no Estado. Durante o evento, que teve como público alvo Médicos Veterinários, Médicos Sanitaristas, Epidemiologistas, Gestores das Regionais de Saúde e Profissionais envolvidos no controle da Raiva, foram levantados temas relevantes sobre a realidade e por vezes, o obstáculo do envio de amostras de alguns Municípios de Pernambuco. Na ocasião, podemos conceber que, o controle e o monitoramento da raiva, é uma realidade ainda pouco difundida e prioritária em alguns Municípios mais distantes da Capital. A distância geográfica e a ausência de treinamento para profissionais envolvidos, também foi destacado como sendo um dos impedimentos para o envio das amostras. Através das palestras e dados compartilhados com o público, foi elaborada uma pactuação entre os Gestores Municipais e a Secretaria

de Saúde do Estado junto ao LACEN/PE, as estratégias de melhorias para a consolidação da qualidade e biossegurança na Vigilância epidemiológica da raiva. Foi acordado o compromisso do Estado: Acompanhar e orientar os trabalhos de capacitação verificando o cronograma de execução das atividades; Fornecer normas e instruções para execução das atividades; Liberar os recursos financeiros previstos para a execução das capacitações e treinamentos; Proporcionar condições físicas e financeiras para a execução das capacitações e supervisões; Estruturar as Regionais de Saúde para o envio das amostras dos Municípios da sua Regional. As amostras, deverão chegar ao laboratório em condições adequadas de serem trabalhadas e para que isso ocorra, se faz necessário que as Normas de Qualidade e de Biossegurança, sejam obedecidas e os profissionais responsáveis pela coleta, acondicionamento e envio desta(s) amostra(s) tenham o conhecimento básico sobre a zoonose e a técnica de coleta padronizada, através da efetiva realização desta pactuação. Podemos avaliar que, a partir deste eventos, e no cumprimento dos acordos entre as partes envolvidas, ocorreu uma melhora significativa. Sabemos que o ideal ainda está em construção mas, o passo inicial se deu, no momento em que a discussão sobre a importância da vigilância epidemiológica da Raiva, foi democratizada e todos se fazem protagonistas nessa luta, que é a erradicação da raiva no Estado de Pernambuco.

#### PT.075 ANÁLISE ESPACIAL DA EPIZOOTIA DE RAIVA OCORRIDA NO MUNICÍPIO DE CAMPINAS/SP/BRASIL NOS ANOS DE 2.000 A 2.002.

Ramos LHM<sup>1</sup>, Donalísio MR<sup>2</sup>, Lourenço RW<sup>3</sup> – <sup>1</sup>Prefeitura Municipal de Campinas – Secretaria Municipal de Saúde, <sup>2</sup>UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Ciências Médicas – Departamento de Saúde Coletiva, <sup>3</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/Faculdade de Engenharia Ambiental

A raiva é uma zoonose que acomete bovinos e equinos (também chamada de raiva dos herbívoros ou dos Animais Domésticos de Interesse Econômico – ADIE), de grande relevância para a saúde pública e animal. É caracterizada por encefalite viral e apresenta elevado coeficiente de letalidade. Nestes animais tem como transmissor o morcego *Desmodus rotundus*. A criação e manutenção de herbívoros ocorre em áreas rurais, com cenários diferentes, isto é, pastagens, matas nativas, reflorestamentos, vales e rios. Ferramentas do geoprocessamento podem ser úteis para o conhecimento da epizootiologia da doença em áreas extensas ou reduzidas. Nos anos 2.000 a 2.002 foi registrada epizootia de raiva em herbívoros em região rural do município de Campinas, todos confirmados laboratorialmente. O objetivo deste trabalho é caracterizar a distribuição espacial dos óbitos de herbívoros e dos abrigos de morcegos hematófagos. A localização e informações dos óbitos animais e dos abrigos de *desmodus* foram coletadas pela Secretaria Municipal de Saúde e pela Secretaria de Agricultura ambas utilizando-se GPS (*Global Position System*). Padronizou o local de óbito a porta de entrada da propriedade em que o animal estava alojado. Foram utilizados os programas computacionais Microsoft Excel®, ArcGIS® versão 9.2, para transferência, e análise dos dados. As variáveis estudadas foram: ano e mês da ocorrência do óbito, espécie animal, localização espacial dos óbitos e dos abrigos de *Desmodus* e tipos de abrigos destes últimos. Foram delimitadas áreas de influência (*buffers*) de 3 km dos abrigos de morcegos. Como resultados, foram georreferenciados 66 (98,5%) registros de mortes de animais em 52 focos, sendo acometidos 40 (59,7%) bovinos e 25 (37,3%) equinos. Não foi evidenciada sazonalidade da doença. Houve deslocamento dos casos na direção sudeste-noroeste, contornando a zona urbana, sugerindo que

esta sirva como obstáculo aos morcegos hematófagos. A maioria dos abrigos localizavam-se próxima a corpos d'água. Foram identificados 10 abrigos de *Desmodus*, todos do tipo artificial. O número médio de morcegos foi de 11 por abrigo. Os *buffers* dos abrigos 3, 5 e 6 concentram a maior número de óbitos registrados. Os resultados mostraram que 25 (37,9%) óbitos estavam contidos em áreas de influência de 3 km de três abrigos próximos (abrigos 3 e/ou 5 e/ou 6). Não foram considerados os abrigos de *Desmodus* localizados nos municípios vizinhos. Verifica-se o caráter rural da doença, porém há vários bairros residenciais circundados pela área rural, o que evidencia o risco de infecção humana. Este trabalho reforça que a incorporação das ferramentas e técnicas de geoprocessamento auxiliaram na compreensão da composição da paisagem e padrões ambientais, da ocupação do solo sendo de grande utilidade na vigilância epidemiológica da raiva como de outras zoonoses. Verifica-se a escassez de trabalhos utilizando ferramentas do geoprocessamento e de análise espacial na ocorrência da raiva.

#### PT.076

### DIAGNOSIS OF RABIES AND EASTERN AND WESTERN EQUINE VIRAL ENCEPHALITIDES IN EQUIDS BY MULTIPLEX HEMI-NESTED RT-PCR TECHNIQUE

Iamamoto K<sup>1</sup>, Durymanova EA<sup>2</sup>, Carrieri ML<sup>1</sup>, Oliveira RN<sup>1</sup>, Carnieli Jr P<sup>1</sup>, Fahl WO<sup>1</sup>, Kotait I<sup>1</sup>, Silva MLCR<sup>3</sup>, Castilho JG<sup>1</sup>, Ito FH<sup>2</sup> – <sup>1</sup>Instituto Pasteur – Diagnóstico, <sup>2</sup>Universidade de São Paulo – FMVZ-USP, <sup>3</sup>UFMG-PB – CSTR-UFMG/PB

Several viral zoonoses affect the equids causing neurological diseases, including rabies and Eastern and Western equine encephalitis (EEE and WEE). Clinical diagnosis is often not conclusive, in a way that laboratory diagnosis is essential. Data from the Laboratory of Rabies Diagnosis at the Pasteur Institute of São Paulo, between 2000 and 2010, demonstrate that approximately 75% of submitted equid samples, which animals presented neurological symptoms, were negative for rabies, emphasizing the importance of achieving a differential diagnosis for equine encephalitis caused by alphaviruses. The aim of this study was to test the suitability of using multiplex hemi-nested RT-PCR for the diagnosis of rabies, EEE and WEE in equids central nervous system samples. We used the primers 21G, 304 and 504 directed to the N gene of rabies virus, and the primers cM3W, M2W, nEEE and nWEE directed the NSP1 gene of WEE and EEE viruses. A preliminary study of the primers was carried out, as well as their use in a hemi-nested RT-PCR, evaluating the optimal annealing temperature, the analytical sensitivity and specificity and the reproducibility of the technique in positive field samples for rabies and EEE. Based on the established protocol for the hemi-nested RT-PCR, variations in reagents concentrations for the multiplex hemi-nested RT-PCR protocol were performed. After establishing the protocol for this reaction, the tests to verify the analytical sensitivity and specificity and reproducibility were performed and the results were compared to those obtained by hemi-nested RT-PCR. In the detection threshold test, the analytical sensitivity was similar for both techniques, resulting in 10<sup>-1.7</sup> for the three standard virus CVS, EEEV and WEEV. In the detection threshold test using a sample with the three viruses, a high specificity of the primers was verified and the multiplex hemi-nested RT-PCR was able to detect the three viruses simultaneously. There was no difference in the proportions of samples detected as positive for rabies obtained by both techniques, according to the Fisher exact test (P = 1.0000). However, for EEE positive field samples, the proportion of samples detected as positive by the hemi-nested RT-PCR a difference in the proportion obtained by multiplex hemi-nested RT-PCR (P < 0.0001) was observed. Although it was not

possible to use WEE positive field samples in this study, the results suggest that its detection would be possible by multiplex hemi-nested RT-PCR. Thus, data suggest that the multiplex hemi-nested RT-PCR technique could be applied to detect rabies and WEE, but with some limitations for the EEE detection, in a way that new studies will be carried out. Financial support: CNPq and Pasteur Institute of São Paulo

#### PT.077

### IMPLEMENTATION OF THE FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE NEUTRALIZATION VIRUS TEST IN RABIES LABORATORY DIAGNOSIS OF PASTEUR INSTITUTE OF SÃO PAULO / BRAZIL

Ferreira JS<sup>1</sup>, Trotti ACP<sup>1</sup>, Scheffer KC<sup>1</sup>, Caporale GMM<sup>1</sup>, Silva ACR<sup>1</sup>, Chaves LB<sup>1</sup> – <sup>1</sup>Instituto Pasteur – Laboratório de Diagnóstico de Raiva

The Fluorescent Antibody Virus Neutralization Test (FAVN) is used routinely in many laboratories for the reference measurement of rabies virus neutralizing antibodies (VNA) in serum of animals to confirm the efficacy of vaccination against rabies, which is required to authorize the transit of these animals in countries free of rabies. The World Organization for Animal Health (OIE) recommends a VNA titer  $\geq 0,5$  IU/mL to ensure that the animal has immunity against the rabies virus. The rabies laboratory diagnosis of Pasteur Institute of São Paulo/Brazil (IP/SP) is a national reference of the Ministry of Health for rabies diagnosis and performs the measurement of VNA in humans and animals serum samples for proof of immunization against rabies. The objective of this study was to implement the FAVN in the laboratory routine of rabies diagnosis at IP/SP using as reference the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT). Initially, the Challenge Virus Standard (CVS) was titrated by the FAVN and RFFIT methods, performing serial dilutions from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-12</sup> and determining the dilution of 100 TCID<sub>50</sub> (50% infectious dose in tissue culture) or 100 FFD<sub>50</sub> (50% of the dose forming focus) for FAVN and RFFIT, respectively. A total of 97 serum samples from animals vaccinated against rabies with different ranges of VNA previously titrated by RFFIT, and 15 samples from unvaccinated animals were selected. Statistical analysis of agreement was performed considering the results in a qualitative analysis (< 0,5 and <sup>3</sup> 0,5) using the Kappa test. The CVS titer was 10<sup>-6</sup> in TCID<sub>50</sub> for FAVN and 10<sup>-5</sup> in FFD<sub>50</sub> for RFFIT. The FAVN showed high specificity with titers < 0,09 IU/mL and LogD<sub>50</sub> < 0,83 in samples from unvaccinated animals. Qualitative analysis of the results showed a substantial agreement between the two methods (kappa = 0,66, p < 0,001). The titles of the sera from vaccinated animals were 0,12 IU/ml to 5,92 IU/ml (GM = 0,92 IU/mL) for FAVN and 0,13 IU/mL to 9,55 IU/mL (GM = 1,34 IU/mL) for RFFIT. The dilution factor in LogD<sub>50</sub> values varied from 0,74 to 2,27 (GM = 1,55) for FAVN and 1,08 to 2,48 (GM = 1,84) for the RFFIT. The obtained results showed concordance within the parameters of specificity and sensitivity between FAVN and RFFIT methods. In this context, the implementation of FAVN in the rabies diagnosis laboratory IP/SP has a great importance for rabies epidemiological investigation by the VNA evaluation in animal serum samples and may complement the techniques already in use in the IP/SP.