

## IMUNODIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA ATRAVÉS DO TESTE ELISA-IgM, EMPREGANDO-SE DIFERENTES PREPARAÇÕES ANTIGÊNICAS A PARTIR DE SOROTIPOS PREVALENTES DE *Leptospira interrogans*.

Marcos Vinicius da SILVA (1, 2), Eide Dias CAMARGO (1), Adelaide José VAZ (1),  
Ana Maria Carvalho de SOUZA (1), Pedro Paulo CHIEFFI (3) & Elena Emiko SAKATA (1)

### RESUMO

Realizou-se estudo comparativo de diferentes sorotipos de *Leptospira interrogans* utilizados na preparação de antígenos empregados no teste ELISA, para a detecção de anticorpos da classe IgM, em amostras de soro na fase precoce e tardia da leptospirose humana.

Foram utilizados dez sorotipos, escolhidos entre os que apresentaram maior reatividade na soroaglutinação microscópica (SAM), na cidade de São Paulo. Os cinco sorotipos que apresentaram melhores resultados individualmente no teste ELISA-IgM (*canicola*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*,  *cynopteri* e *brasiliensis*), foram também estudados em mistura antigênica.

Os antígenos não tratados apresentaram maior reatividade do que os antígenos tratados com Triton X — 100 (4%) à temperatura de 50°C, durante 4 horas.

O teste ELISA-IgM empregando os sorotipos não tratados, isoladamente, e em mistura antigênica, mostrou-se altamente sensível, podendo ser empregado como teste de triagem para o diagnóstico precoce da leptospirose humana. Outra aplicação do teste é permitir a detecção do início de situações epidêmicas ou de surtos, possibilitando acionar medidas de vigilância epidemiológica.

**UNITERMOS:** Leptospirose; Teste Imunoenzimático (ELISA) IgM.

### INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de grande importância em nosso meio, com alta incidência tanto em humanos como em animais.

A doença é causada pela *Leptospira interrogans*, que engloba mais de 180 sorotipos. Estes diferentes sorotipos apresentam homologia entre si, o que determina reações cruzadas, principalmente intragrupo, dificultando a determina-

ção precisa do sorotipo infectante. Por outro lado, essas reações cruzadas permitem utilizar um número reduzido de sorotipos como antígenos nos testes imunodiagnósticos para detectar anticorpos<sup>1, 4, 25, 26</sup>.

Na escolha dos sorotipos de leptospirosas a serem utilizados na preparação dos antígenos, deve-se considerar os de maior prevalência na

Financiado pelo CNPq — Processo 407374/87.

(1) Instituto Adolfo Lutz. Seção de Sorologia. Av. Dr. Arnaldo, 351 - 10º andar. Caixa Postal 7027. CEP 01246, São Paulo, SP, Brasil.

(2) Hospital Emílio Ribas. São Paulo, SP, Brasil.

(3) Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

área em estudo, implicados tanto na forma grave da doença (icterohemorrágica) como na benígna.

Várias preparações antigênicas já foram utilizadas nos testes sorológicos, na tentativa de se obter um antígeno específico, e de melhor sensibilidade. Na reação de soroaglutinação microscópica em campo escuro (SAM), preconizada pela Organização Mundial de Saúde<sup>7</sup>, emprega-se como antígeno leptospiros íntegras. Outros testes como: fixação de complemento, reação de hemaglutinação, imunofluorescência, contraímunoelctroforese, radioímunoensaio, imunoenzimático (ELISA e Dot-ELISA), têm sido realizados com diferentes metodologias de extração e purificação antigênica, sempre em busca de melhores resultados<sup>3, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28</sup>.

Este trabalho tem como objetivo estabelecer a preparação antigênica e os sorotipos que apresentam melhor reatividade e o seu comportamento, quando empregados isolados e em mistura antigênica no teste imunoenzimático para a detecção de anticorpos circulantes da classe IgM (ELISA-IgM) na leptospirose humana.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1) ANTÍGENO

Foram utilizados os sorotipos de leptospiros que mais freqüentemente apresentaram resultados positivos no teste de soroaglutinação microscópica em campo escuro (SAM), realizado no Instituto Adolfo Lutz. Diferentes metodologias de preparação antigênica foram empregadas:

1.1 antígeno bruto, preparado de acordo com a metodologia descrita por ADLER et al.<sup>2</sup>, modificada por SILVA et al.<sup>22</sup>. Foram utilizadas para a obtenção dos antígenos, culturas de *Leptospira interrogans* dos seguintes sorotipos: **castellonis**, **panama**, **canicola**, **hebdomadis**, **grippotyphosa**, **pomona**, **icterohaemorrhagiae**, **autumnalis**, **cynopteri** e **brasilensis**.

1.2 antígeno submetido a tratamento físico-químico, conforme metodologia descrita por MYERS<sup>15</sup>, com algumas modificações: fo-

ram utilizadas culturas de *Leptospira interrogans*, sorotipos: **castellonis**, **panama**, **canicola**, **hebdomadis**, **grippotyphosa**, **icterohaemorrhagiae**, **pomona** e **autumnalis**, em meio EMJH. No 7º dia de crescimento com aproximadamente  $5 \times 10^7$  leptospiros/ml, foram congeladas a -20°C, durante 40 dias. Após o descongelamento e centrifugação a 10.000 xg durante 45 minutos a 4°C, as leptospiros foram ressuspensas com solução fosfatada tamponada, 0,02 M, pH 7,2 (PBS), acrescidas de Triton X-100 a 4% (V/V), e foram incubadas em banho-maria à 50°C, com agitação ocasional durante 4 horas e submetidas a nova centrifugação. O sobrenadante foi separado e empregado individualmente como antígeno no teste ELISA IgM. O sedimento foi ressuspenso em 8 ml de PBS e tratado com ultra-som, ciclos de 20 Khz, 0,8 mA, com 3 ciclos de um minuto, e empregado isoladamente como antígeno no teste ELISA-IgM.

As três preparações antigênicas não submetidas ao tratamento, sedimento do pós-tratamento e respectivo sobrenadante, foram empregadas nas mesmas concentrações protéicas<sup>22</sup>, e armazenadas a -20°C até o momento do uso no teste ELISA-IgM.

### 2) AMOSTRAS DE SORO

2.1 Soros padrões positivo e negativo: O soro padrão positivo foi obtido de paciente com leptospirose comprovada clínica e laboratorialmente (teste de soroaglutinação microscópica em campo escuro — SAM)<sup>7</sup>; e o soro padrão negativo de indivíduo sadio, sem antecedentes clínico-epidemiológicos e laboratorialmente negativo (SAM) para leptospirose.

2.2 Amostras pareadas de soro de 41 pacientes com leptospirose, coletadas com intervalo médio de 13,8 dias entre a primeira e a segunda amostra. As primeiras amostras foram negativas e as segundas positivas para leptospirose pelo teste SAM.

2.3 Amostras de soro do grupo controle, constituído por 30 indivíduos adultos aparentemente sadios, sem antecedentes clínicos e

epidemiológicos para leptospirose (11 homens e 19 mulheres) e 30 soros de pacientes com outras patologias: hepatite B (n = 2), febre tifóide (n = 2), febre amarela (n = 1), dengue (n = 1), citomegalovirose (n = 1), sífilis (n = 4), doença de Chagas (n = 4), malária (n = 3), leishmaniose cutâneo-mucosa (n = 4), mononucleose infecciosa (n = 1), sarampo (n = 1), artrite reumatóide (n = 1), lúpus eritematoso (n = 3) e febre reumática (n = 2).

### 3) TESTES IMUNODIAGNÓSTICOS

3.1 teste imunoenzimático para detecção de anticorpos da classe IgM (ELISA-IgM), padronizado conforme metodologia descrita por MILNER et al.<sup>13</sup>, modificada por SILVA et al.<sup>22</sup>, utilizando conjugado anti-IgM humano-fosfatase alcalina (SIGMA-USA), com o tempo de incubação com a solução cromógena reduzido de 45 para 25 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas (MULTISKAN-MCC, FLOW, USA) no comprimento de onda de 409 nm. O limiar de reatividade do teste para cada um dos antígenos empregados foi determinado pela média aritmética dos resultados, em densidade óptica, das amostras do grupo controle, na diluição do soro 1:200, acrescida de três desvios padrões.

3.2 teste de soroaglutinação microscópica em campo escuro (SAM), realizado de acordo com as normas da Organização Mundial de Saúde<sup>7</sup>, utilizando-se os seguintes sorotipos de leptospirose: *icterohaemorrhagiae*, *cope-nhageni*, *grippotyphosa*, *canicola*, *pomona*, *wolffi*, *australis*, *bataviae*, *panama*, *patoc*, *tarassovi*, *brasiliensis*, *castellonis*, *pyrogenes*, *javanica*, *autumnalis*, *butembo*, *shermani*, *andamana*, *djasiman*, *celledoni*, *cynopteri* e *hebdomadis*, sendo considerado como positivo quando houve reatividade com um ou mais dos vinte e três sorotipos utilizados no teste, a partir da diluição do soro 1:200.

### 4) ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste  $\chi^2$  de MacNemar foi utilizado para verificar a significância. Foram calculados

também os índices de sensibilidade e especificidade<sup>8</sup>.

## RESULTADOS

Foi determinado o limiar de reatividade para cada um dos sorotipos de leptospirose empregados como antígeno no teste ELISA IgM, a partir das médias aritméticas dos resultados, em densidade óptica, das 60 amostras de soros do grupo controle, acrescidos de três desvios padrões, utilizando-se preparações antigênicas bruta e o sedimento obtido após tratamento físico-químico (tabela 1).

Os resultados dos soros padrões positivo e negativo, obtidos com o emprego do sobrenadante da preparação tratada físico-quimicamente, não foram significativos (dados não apresentados), não se empregando esta preparação neste estudo.

TABELA 1

Limiar de reatividade em densidade óptica (DO) para cada sorotipo de *Leptospira interrogans*, em diferentes preparações antigênicas, utilizados no teste ELISA-IgM.

Sorotipo	Antígeno	
	a D.O.*	b D.O.*
castellonis	0,749	0,432
panama	0,543	0,381
canicola	0,400	0,492
hebdomadis	0,402	0,328
grippotyphosa	0,451	0,348
icterohaemorrhagiae	0,340	0,311
pomona	0,515	0,298
autumnalis	0,778	0,365
cynopteri	0,407	NR
brasiliensis	0,449	NR

a = antígeno não tratado.

b = antígeno obtido do sedimento das culturas de leptospirose, ressuspensão em PBS após tratamento com agentes químico e físico simultaneamente.

\* = limiar de reatividade = média de densidade óptica (DO) dos 60 soros (grupo controle) acrescida de três desvios padrões.

NR = não realizado.

Os resultados do teste ELISA-IgM utilizando as preparações antigênicas bruta e tratada, para as primeiras e segundas amostras de soro dos pacientes com leptospirose são apresentados na Tabela 2. As 41 amostras colhidas no início da doença (1ªs amostras) foram negativas aplicando-se o teste SAM, e as na fase tardia (2ªs amostras) foram positivas.

A especificidade do teste ELISA-IgM, empregando cada um dos dez sorotipos nas duas preparações antigênicas estudadas, foi de 100%, calculado a partir dos resultados das 60 amostras do grupo controle. O teste SAM aplicado às mesmas amostras, foi positivo em 9 amostras (especificidade de 85%), sendo 3 de indivíduos normais e 6 de pacientes com outras patologias.

O teste de MacNemar foi aplicado para verificar a significância dos resultados obtidos entre os testes ELISA-IgM empregando o antígeno não tratado e o SAM para cada sorotipo estudado (Tabela 3).

Pela análise das Tabelas 1 e 2 foram escolhidos os cinco sorotipos que apresentaram os melhores resultados: *canicola*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *cynopteri* e *brasiliensis*. A partir destes, foi preparada uma mistura antigênica homogênea, com concentração protéica final de

3 µg/ml. Esta mistura antigênica só foi estudada para as preparações antigênicas não tratadas.

O teste ELISA-IgM empregando a mistura antigênica foi aplicado às 60 amostras de soro do grupo controle, resultando uma densidade óptica de 0,153, que acrescida de 3 desvios padrões estabeleceu o limiar de reatividade de 0,382. O mesmo ensaio foi realizado para as amostras de soro dos 41 pacientes com leptospirose. Das 41 amostras colhidas no início da doença 29 (70,73%) foram positivas e das segundas amostras (fase tardia), todas as 41 (100%) foram positivas.

## DISCUSSÃO

O aprimoramento do imunodiagnóstico na leptospirose humana vem auxiliar o médico que poderá dispor de recursos laboratoriais para a

TABELA 2

Positividade do teste ELISA-IgM com diferentes preparações antigênicas em amostras de soro de 41 pacientes com leptospirose, no início da doença (1ªs amostras, negativas pela SAM) e na fase tardia (2ªs amostras, positivas pela SAM).

Sorotipo	Antígeno	Teste ELISA — IgM POSITIVO			
		1ªs amostras		2ªs amostras	
		a n (%)	b n (%)	a n (%)	b n (%)
<i>L. castellanis</i>	*	21 (51,2)	1 (2,4)*	29 (70,7)	25 (61,0)****
<i>L. panama</i>		24 (58,5)	3 (7,3)*	34 (82,9)	33 (80,5)****
<i>L. canicola</i>		30 (73,2)	18 (43,9)*	38 (92,7)	39 (95,1)****
<i>L. hebdomadis</i>		32 (78,1)	4 (9,8)*	38 (92,7)	28 (68,3)*
<i>L. grippityphosa</i>		19 (46,4)	3 (7,3)*	28 (68,3)	26 (63,4)***
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>		31 (75,6)	14 (34,2)*	40 (97,6)	40 (97,6)****
<i>L. pomona</i>		22 (53,6)	16 (39,0)**	33 (80,5)	39 (95,1)**
<i>L. autumnalis</i>		20 (48,8)	4 (9,8)*	10 (24,4)	38 (92,7)*
<i>L. cynopteri</i>		31 (75,6)	NR	40 (97,5)	NR
<i>L. brasiliensis</i>		28 (68,2)	NR	37 (90,2)	NR

a = antígeno não tratado.

b = antígeno obtido do sedimento das culturas de leptospiros, ressuspenso em PBS após tratamento com agentes químico e físico simultaneamente.

teste SAM: 1ªs amostras = todas negativas.

2ªs amostras = todas positivas.

NR = não realizado.

teste de MacNemar: ELISA-IgM X SAM.

\*  $p < 0,005$ ; \*\*  $0,010 < p < 0,025$ ; \*\*\*  $0,025 < p < 0,050$ ; \*\*\*\*  $p > 0,050$

TABELA 3

Resultados do teste de significância entre os testes ELISA-IgM e SAM aplicados às primeiras e segundas amostras de soro, de 41 pacientes com leptospirose, frente aos diversos sorotipos.

Sorotipo	* Teste de Significância: ELISA-IgM X SAM	
	1 <sup>as</sup> amostras	2 <sup>as</sup> amostras
<i>L. castellanis</i>	p < 0,005	p < 0,005
<i>L. panama</i>	p < 0,005	0,005 < p < 0,010
<i>L. canicola</i>	p < 0,005	p > 0,050
<i>L. hebdomadis</i>	p < 0,005	p > 0,050
<i>L. grippotyphosa</i>	p < 0,005	p < 0,005
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	p < 0,005	p > 0,050
<i>L. pomona</i>	p < 0,005	p < 0,005
<i>L. autumnalis</i>	p < 0,005	p < 0,005
<i>L. cynopteri</i>	p < 0,005	p > 0,050
<i>L. brasiliensis</i>	p < 0,005	p > 0,050

teste SAM: 1<sup>as</sup> amostras = todas negativas; 2<sup>as</sup> amostras = todas positivas.

\* teste de MacNemar.

confirmação diagnóstica, e ampliar os conhecimentos acerca desta patologia.

Através da experiência do Instituto Adolfo Lutz em leptospirose, foram estabelecidos os sorotipos que em nosso meio, mais frequentemente apresentam resultados positivos no teste SAM: **castellanis**, **panama**, **canicola**, **hebdomadis**, **grippotyphosa**, **icterohaemorrhagiae**, **pomona**, **autumnalis**, **cynopteri** e **brasiliensis**.

Estudou-se o comportamento individual de cada sorotipo frente a três diferentes processos de obtenção de antígeno, com a finalidade de estabelecer os melhores resultados no teste ELISA-IgM para a leptospirose humana. Os procedimentos para obtenção do antígeno a partir dos sorotipos de leptospirosas foram: não tratamento, sedimento e sobrenadante do tratamento das leptospirosas com Triton X-100. Este último não apresentou resultados adequados e foi eliminado do estudo.

Os valores do limiar de reatividade do teste ELISA-IgM utilizando o antígeno (sedimento) tratado, foram menores do que os obtidos com o antígeno não tratado, para todos os sorotipos (Tabela 1). A grande variação de densidade óptica observada de 0,340 a 0,778, sugere que alguns sorotipos apresentam maior especificidade entre o antígeno e o respectivo anticorpo.

A sensibilidade do teste ELISA-IgM empregando-se as duas diferentes preparações antigênicas, para os dez sorotipos estudados, foi determinada a partir dos resultados das amostras de soro dos 41 pacientes com leptospirose (Tabela 2).

Para as amostras de soro na fase inicial da doença os melhores resultados no teste ELISA-IgM foram obtidos com a preparação antigênica não tratada, enquanto na fase tardia, as duas preparações não apresentaram diferenças significativas, com exceção dos sorotipos **hebdomadis** e **autumnalis**. O tratamento físico-químico para a obtenção do antígeno apresentou bons resultados quando empregados na contraímuno-elektroforese (MYERS-1987), o mesmo não ocorrendo neste estudo, para o teste ELISA-IgM.

Os resultados evidenciam a existência de reações cruzadas entre os diferentes sorotipos de *Leptospira interrogans*, o que sugere a possibilidade do emprego de uma mistura antigênica dos sorotipos mais reativos, no teste ELISA-IgM.

Em estudo anterior (SILVA), empregando a cepa Patoc 1 (não patogênica) no teste ELISA-IgM, a sensibilidade para as amostras precoces foi inferior (51,22%) a aqui observada, empregando individualmente sorotipos patogênicos: **canicola** (73,2%), **hebdomadis** (78,1%), **icterohaemor-**

*rhagiae* (75,6%), *cynopteri* (75,6%) e *brasiliensis* (68,2%), e em mistura antigênica (70,73%). Os resultados dos antígenos obtidos de leptospirosas patogênicas, não apresentaram diferença significativa, quando empregados isolados ou em mistura antigênica, no teste ELISA-IgM.

O teste ELISA-IgM não apresentou reação falso positiva no grupo controle (especificidade de 100%), já no teste SAM a especificidade foi menor (85%).

Os resultados obtidos no teste ELISA-IgM empregando mistura antigênica apresentaram sensibilidade de 70,73% e 100% respectivamente para as primeiras e segundas amostras, níveis observados para cada um dos sorotipos isoladamente ( $p > 0,05$ ). Este resultado sugere que a mistura de antígenos dos sorotipos mais prevalentes pelo teste SAM em uma região, pode ser utilizada no teste ELISA-IgM para a leptospirose humana, sem perda de sensibilidade e especificidade, podendo o teste ser aplicado em triagem sorológica.

Por outro lado, a precocidade do teste ELISA-IgM permite confirmação diagnóstica rápida e segura, útil também em situações epidêmicas ou de surtos, possibilitando acionar medidas de vigilância epidemiológica.

### SUMMARY

**Immunodiagnostic of human leptospirosis by ELISA-IgM, employing different antigenic preparations as from prevalent serovars of *Leptospira interrogans*.**

A comparative study among different serovars of *Leptospira interrogans* was performed in order to prepare antigens to detect IgM antibodies by ELISA in early and late phase of human leptospirosis.

Ten serovars were chosen among the most prevalent detected by microscopic seroagglutination (SAM) in São Paulo city. Using ELISA-IgM five of them showed better results (*canicola*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *cynopteri* and *brasiliensis*). These ones were also studied in a pool.

The non-treated antigens showed higher reactivity than the Triton X-100 (4%/50°C/4h).

ELISA-IgM using individually or pool of non treated antigens proved to be reliable with high sensitivity and should be used for an earlier diagnosis of leptospirosis, as a trial test. Faster diagnostic elucidation can be useful to detect epidemic situations, so, allowing epidemiological surveillance interventions.

### AGRADECIMENTOS

À Dra. MARINA ORTOLAN, da Seção de Coleção de Culturas, pela manutenção e fornecimento de *Leptospira*; à DULCE MARIA DE SOUZA e Dra. LIA DE ABREU SACCHETTA, da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes, do Instituto Adolfo Lutz, pelas colaborações na revisão do texto.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, B. & FAINE, S. — The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. *J. med. Microbiol.*, 11: 387-400, 1978.
2. ADLER, B.; MURPHY, A. M.; LOCARNINI, S. A. & FAINE, S. — Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulin M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. clin. Microbiol.*, 11: 452-457, 1980.
3. ADLER, B.; CHAPPEL, R. J. & FAINE, S. — The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, 252A: 405-413, 1982.
4. ADLER, B.; BALLARD, S. & FAINE, S. — ELISA test for leptospirosis. *Med. J. Aust.*, 141: 685-686, 1984.
5. ARIMITSU, Y. & MATUNASI, T. — Serodiagnosis of leptospirosis in China by the one-point MCA method. *Epidem. Infect.*, 99: 393-398, 1987.
6. CHAPMAN, A. J.; ADLER, B. & FAINE, S. — Antigens recognised by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar hardyo. *J. med. Microbiol.*, 25: 269-278, 1988.
7. FAINE, S. ed. — *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, World Health Organization, 1982. (WHO off-set publication No. 67).
8. GUEDES, M. L. S. & GUEDES, J. B. — *Bioestatística para profissionais da Saúde*. Rio de Janeiro, Ao Livro Técnico; Brasília, CNPq, 1988.

9. IMAMURA, S.; MATSUI, H. & ASHIZAWA, Y. — Studies on indirect hemagglutination test for leptospirosis. *Jap. J. exp. Med.*, 42: 563-568, 1972.
10. MAILLOUX, M.; MAZZONELLI, J. G. & DUFRESNE, Y. — Application of an immuno-enzyme technique to titration of antibodies in leptospirosis: ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig.*, 257A: 511-513, 1984.
11. MAILLOUX, M.; DUFRESNE, Y.; MAZZONELLI, J. & MAZZONELLI, G. T. D. — Intérêt de la méthode ELISA dans le diagnostic des leptospiroses. *Med. Mal. infect.*, 14(3): 107-109, 1984.
12. MAILLOUX, M. & DUFRESNE, Y. — Le diagnostic immunologique des leptospiroses: comparaison de la technique ELISA à la réaction d'agglutination-lyse. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 3: 363-367, 1985.
13. MILNER, A. R.; JACKSON, K. B.; WOODRUFF, K. & SMART, I. J. — Enzyme linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infections caused by *Leptospira interrogans* serovar *hardyo*. *J. clin. Microbiol.*, 22: 539-542, 1985.
14. MYERS, D. M. — Evaluación de antígenos de la envoltura externa de *Leptospira*, en las pruebas de fijación de complemento y de hemaglutinación para la leptospirosis. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 87: 141-151, 1979.
15. MYERS, D. M. — Serodiagnosis of human leptospirosis by counterimmunoelectrophoresis. *J. clin. Microbiol.*, 25: 897-899, 1987.
16. PALMER, M. F.; WAITKINS, S. A.; FITZGEORGE, R. B. & BASKERVILLE, A. — Experimental infection of monkeys with *Leptospira interrogans* serovar *hardyo*. *Epidem. Infect.*, 98: 191-197, 1987.
17. POPE, V. & JOHNSON, R. C. — Effect of heat or chemical treatment on leptospiral antigen. *J. clin. Microbiol.*, 25: 255-258, 1987.
18. RIBEIRO, M. A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L. K.; TAKEDA, A. K. & CORRÊA, M. O. A. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroaglutinação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41: 135-143, 1981.
19. RIBEIRO, M. A.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; PIRES, R. B. R.; MELHEM, M. S. C.; VIANNA, T. H. S. & CAVALCANTE, Z. M. O. — Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44: 35-40, 1984.
20. SANTA ROSA, C. A. — Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 1: 9-109, 1970.
21. SEKI, M.; SATO, T.; ARIMITSU, Y.; MATUMASI, T. & KOBAYASHI, S. — Over point method for serological diagnosis of leptospirosis: a microcapsule agglutination test. *Epidem. Infect.*, 99: 399-405, 1987.
22. SILVA, M. V.; CAMARGO, E. D.; VAZ, A. J.; SOUZA, A. M. C.; UEDA, M. & SAKATA, E. E. — Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe IgM na leptospirose humana. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 30: 95-100, 1988.
23. TERPSTRA, W. J.; LIGTHART, G. S. & SCHOONE, G. J. — Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA). *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig.*, 247A: 400-405, 1980.
24. THIEMANN, A. B. & GARRETT, L. A. — Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars *hardyo* and *pomona* in cattle. *Amer. J. vet. Res.*, 44: 884-887, 1983.
25. YASUDA, P. — Novas técnicas e perspectivas do diagnóstico das leptospiroses. *Hiléia méd. (Belém)*, 8: 41, 1987.
26. YASUDA, P. H.; STEIGERWAL, T. A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F. & BRENNER, Don. J. — Desoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven New *Leptospira* species. *Int. J. system. Bact.*, 4: 407-415, 1987.
27. WALTMAN, W. D. & DAWE, D. L. — Enzyme-linked immunosorbent assay, for the detection of antileptospiral antibodies in swine sera. *Amer. J. vet. Res.*, 44: 1120-1122, 1983.
28. WATT, G.; ALQUIZA, L. M.; PADRE, L. P.; TUAZON, M. L. & LAUGHLIN, L. W. — The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the Dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test different stages of illness. *J. infect. Dis.*, 157: 840-842, 1988.

Recebido para publicação em 10/5/1989.