

Avaliação do teste de aglutinação microscópica utilizando-se como antígeno leptospiras saprófitas para o diagnóstico da leptospirose humana

Evaluation of microscopic agglutination test using saprophytic leptospire for diagnosis of human leptospirosis

RIALA6/1641

Roberta Morozetti BLANCO*, Ana Paula CASSIOLATO, Eliete Caló ROMERO

*Endereço para correspondência: Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, 9º andar, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068-2897. E-mail: rmozetti@yahoo.com.br

Recebido: 17.11.2014 - Aceito para publicação: 28.04.2015

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de efetuar o diagnóstico precoce do teste de aglutinação microscópica (MAT) utilizando-se como antígeno leptospiras saprófitas sorovar Patoc (MAT-Patoc). Neste contexto, os resultados obtidos em amostras de soro de casos confirmados de leptospirose foram comparados com aqueles obtidos no teste ELISA IgM. Cento e cinquenta e oito amostras colhidas na fase aguda da doença foram analisadas pelo MAT-Patoc. Os soros com títulos ≥ 50 foram considerados reagentes. A sensibilidade do MAT-Patoc e do ELISA-IgM foi de 13,29 % e 28,48 %, respectivamente. Nos sete primeiros dias da doença, o MAT-Patoc foi capaz de detectar 12,29 % dos casos, enquanto o ELISA-IgM detectou 24,59 %. O MAT-Patoc foi reagente em amostras de casos cujos prováveis sorogrupos infectantes foram Icterohaemorrhagiae, Cynopteri e Ballum. Em conclusão, a utilização do teste MAT-Patoc apresentou menor sensibilidade no diagnóstico quando comparado ao ELISA-IgM, embora tenha sido reagente em algumas amostras com resultado não reagente. O MAT-Patoc deve ser utilizado em combinação com ELISA-IgM para melhorar a sensibilidade do diagnóstico de leptospirose na primeira fase da doença, com subsequente confirmação pelo MAT de referência.

Palavras-chave. leptospirose, ELISA-IgM, MAT, sorovar Patoc.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the early detection of antibodies by the microscopic agglutination test (MAT) using saprophytic leptospira serovar Patoc (MAT-Patoc), in serum samples from patients with confirmed leptospirosis. The obtained results were compared with those found in ELISA-IgM. A hundred fifty-eight serum samples collected from patients in acute phase of illness were analysed by MAT-Patoc. Samples with titers ≥ 50 were considered positive. The sensitivity of MAT-Patoc and IgM-ELISA was 13.29 % and 28.48 %, respectively. In the first seven days of the disease, MAT-Patoc was positive in 12.29 % of the cases, while the IgM-ELISA was positive in 24.59 %. The MAT-Patoc was positive in sera from confirmed cases, and the infecting serogroups were Icterohaemorrhagiae, Cynopteri and Ballum. In conclusion, the use of MAT-Patoc test showed lower sensitivity for diagnosing leptospirosis when compared with ELISA-IgM, although positive reactivity was found in some samples with negative results. The MAT-Patoc should be used in combination with ELISA-IgM to improve the sensitivity of the diagnosis of leptospirosis in the first phase of the disease, with subsequent confirmation by standard MAT.

Keywords. leptospirosis, ELISA-IgM, MAT, serovar Patoc.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* spp. A doença, em humanos, pode manifestar-se de várias formas, desde quadros assintomáticos até formas severas e potencialmente fatais^{1,2}. A forma grave da doença ocorre em apenas 5 a 10 % dos indivíduos infectados, porém, a maioria dos casos tem apresentação clínica inespecífica, frequentemente confundida com outras doenças febris, tais como dengue e febre amarela^{1,3}. Assim, testes diagnósticos que detectem a doença precocemente são necessários para auxiliar na identificação de casos clínicos. A cultura para leptospirose consiste em isolar leptospirosas diretamente do sangue e/ou do líquido cefalorraquidiano (LCR) colhidos na primeira semana de sintomatologia e semeados em meios de cultura específicos. Porém, devido ao crescimento lento das leptospirosas, o resultado pode demorar até quatro meses. Além disso, a cultura possui baixa sensibilidade diagnóstica devido ao período crítico de coleta e da presença de contaminantes que acabam inibindo o crescimento de leptospirosas^{1,3-5}.

Vários testes moleculares, tais como reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real, têm sido desenvolvidos para a detecção precoce de leptospirosas⁶⁻⁹. Porém, como há dificuldades referentes à suspeita de caso no início da doença e a sensibilidade da PCR diminui à medida que o paciente evolui para as fases tardias da leptospirose, os testes sorológicos são os métodos de escolha, sendo os mais comumente utilizados o teste de ELISA-IgM e o teste de aglutinação microscópica (MAT)^{10,11}.

O teste ELISA-IgM é um método de triagem, gênero-específico, que detecta anticorpos mais precocemente que o MAT, a partir do sexto dia após o início dos sintomas¹². O MAT é um método considerado como padrão-ouro recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que fornece o provável sorogrupo infectante e utiliza leptospirosas vivas, potencialmente patogênicas, para a realização do teste, oferecendo risco ao operador e necessitando de técnicos especializados e treinados para proceder à leitura em microscopia de campo escuro^{3,13}. Técnicas alternativas têm sido

estudadas a fim de oferecer maior rapidez, segurança e precocidade para o diagnóstico laboratorial da leptospirose¹⁴⁻¹⁹. Estudos demonstraram que cepas de leptospirosas saprófitas podem aglutinar com soros contendo anticorpos contra leptospirosas patogênicas, sendo o sorovar Patoc o mais utilizado em testes para o diagnóstico da leptospirose humana²⁰⁻²⁴. O objetivo desse trabalho foi avaliar a precocidade do MAT utilizando leptospirosas saprófitas pertencentes ao sorovar Patoc (MAT-Patoc), comparando com resultados obtidos pelo teste ELISA-IgM, em amostras de soro de casos de leptospirose, previamente confirmados pelo MAT de referência, colhidos na fase aguda da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras clínicas

Foram utilizadas amostras de soro colhidas na fase aguda da doença de 158 casos de leptospirose confirmados pelo MAT, recebidas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) Central, no período de janeiro de 2004 a abril de 2011, e estocadas a -20 °C.

Os dados dos pacientes, tais como as datas de coleta do material e aparição de primeiros sintomas, foram obtidos a partir de informações presentes nas fichas de notificação.

MAT

O MAT utilizado na confirmação dos casos, foi realizado segundo Faine et al³ utilizando sorovares representantes dos principais sorogrupos de leptospirosas circulantes em São Paulo, Brasil: Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Hardjo, Sejroe, Pyrogenes, Tarassovi e Wolfii. Todas as cepas foram mantidas em meio de cultura líquido Elinghausen McCullough Johnson Harris - EMJH (Difco, Sparks, MD, USA), com repiques semanais e incubação de 28-30 °C.

Os casos foram considerados confirmados quando apresentaram soroconversão, ou seja, primeira amostra negativa e segunda amostra com título ≥ 200 , em amostras pareadas de soro, sendo uma coletada na fase aguda e a outra na

fase de convalescença. O provável sorogrupo infectante foi o que apresentou o maior título e quando dois ou mais sorogrupos apresentaram o maior título, foi considerado inconclusivo.

MAT-Patoc

O MAT-Patoc foi realizado utilizando como antígeno *Leptospira biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1.

Foram utilizados controles positivo e negativo. Os soros foram triados e quando reagentes, foram titulados em diluições seriadas de razão 2. O título foi determinado pela reação onde houve aglutinação de pelo menos 50 % das leptospirosas em comparação ao controle negativo.

Leptospira biflexa sorovar Patoc cepa Patoc 1 foi mantida em meio de cultura líquido Elinghausen McCullough Johnson Harris - EMJH (Difco, Sparks, MD, USA), com repiques semanais e incubação de 28-30 °C.

O MAT-Patoc foi considerado reagente quando apresentou título ≥ 50 .

ELISA-IgM

O teste Elisa-IgM foi realizado conforme instruções do fabricante (Panbio Pty Ltd, Austrália). Os resultados foram considerados reagentes, não reagentes e inconclusivos segundo cálculo do *cut off* fornecido pelo *kit* e pelos valores de absorvância de cada amostra de soro.

Resumidamente, adicionou-se 100 μ L de amostras de soro, controles positivo e negativo e calibrador de *cut off*, diluídos a 1:100 em diluente de amostra, em placa de ELISA com 96 micropoços revestidos com leptospirosas. A placa foi incubada durante 30 min a 37 °C.

Após lavagem com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05 % de Tween 20, adicionou-se 100 μ L de anticorpo anti-IgM humano conjugado com peroxidase e incubou-se durante mais 30 min a 37 °C. Após lavagem, adicionou-se 100 μ L de substrato de tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio (cromógeno TMB) e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 min. A reação foi interrompida com 100 μ L de ácido fosfórico 1 M. A absorvância de cada poço foi medida a um comprimento de onda de 450 nm.

RESULTADOS

De 158 amostras de soro colhidas na fase aguda da doença, 21 e 45 apresentaram resultados reagentes nos testes de MAT-Patoc e ELISA-IgM, respectivamente. A sensibilidade dos testes comparada ao método de referência MAT foi de 13,29 % para o teste de MAT-Patoc e de 28,48 % para ELISA-IgM.

De 99 amostras que apresentaram resultado não reagente no ELISA-IgM, 12 apresentaram resultado reagente no MAT-Patoc; 14 amostras que apresentaram resultado inconclusivo no ELISA-IgM, apresentaram resultado não-reagente no MAT-Patoc. A comparação entre os resultados dos testes MAT-Patoc e ELISA-IgM está descrita na Tabela 1.

Dos 158 casos de leptospirose analisados, os prováveis sorogrupos infectantes foram Icterohaemorrhagiae (50,0 %), Cynopteri (6,3 %), Autumnalis (5,0 %), Sejroe (3,1 %), Hebdomadis (3,1 %), Canicola (1,8 %), Pyrogenes (1,8 %), Australis (1,8 %), Ballum (1,2 %), Grippotyphosa (0,6 %), Tarassovi (0,6 %), Celledoni (0,6 %) e Djasiman (0,6 %).

Tabela 1. Comparação dos resultados dos testes MAT-Patoc e ELISA-IgM em 158 amostras colhidas na fase aguda de casos confirmados de leptospirose

ELISA IgM	MAT-Patoc		Total
	Reagente	Não reagente	
Reagente	9	36	45
Inconclusivo	0	14	14
Não reagente	12	87	99
Total	21	137	158

Em 22,7 % dos casos não foi possível determinar o provável sorogrupo infectante, sendo considerados inconclusivos.

As 21 amostras que apresentaram resultado reagente no MAT-Patoc eram de casos que tinham como provável sorogrupo infectante *Icterohaemorrhagiae* (57,1 %), *Cynopteri* (4,7 %) e *Ballum* (4,7 %), além de 33 % cuja determinação do sorogrupo foi inconclusiva. De acordo com as informações encontradas nas fichas de notificação, 122 amostras foram coletadas do 1º ao 7º dia de doença. Dessas, 15 (12,29 %) apresentaram resultado reagente no MAT-Patoc e 30 (24,59 %) apresentaram resultado reagente no ELISA IgM (Tabela 2).

Das amostras reagentes no MAT-Patoc, 15 amostras apresentaram título de 50, cinco amostras título de 100 e uma amostra título de 200.

DISCUSSÃO

A leptospirose é considerada uma zoonose emergente, devido ao aumento da incidência e a ocorrência de epidemias em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento^{25,26}.

O diagnóstico precoce da leptospirose é de extrema importância, já que os sintomas podem ser confundidos com o de outras doenças febris. Além disso, acredita-se que o tratamento no período inicial da doença possa beneficiar o paciente evitando a evolução para a forma grave da doença. O diagnóstico laboratorial é baseado principalmente em técnicas sorológicas como ELISA-IgM, teste gênero específico utilizado em amostras colhidas na fase aguda da doença e o

MAT, teste padrão ouro que proporciona resposta a partir da primeira semana da doença. O MAT é o teste utilizado para confirmar os casos de leptospirose e fornece o provável sorogrupo infectante por utilizar um painel de sorovares representantes dos principais sorogrupos circulantes.

Apesar de vários testes moleculares, tais como PCR e PCR em tempo real, terem sido desenvolvidos para o diagnóstico precoce da leptospirose, alguns materiais clínicos como soros não são ideais para serem utilizados nessas técnicas^{10,27}. Esses métodos são restritos a poucos laboratórios devido aos altos custos e à complexa infra-estrutura necessária. Além disso, a sensibilidade diminui à medida que o paciente evolui para fases tardias da doença, período em que geralmente o paciente procura atendimento e ocorre a suspeita da leptospirose^{10,11}.

O uso de leptospirosas saprófitas em testes sorológicos para o diagnóstico da leptospirose tem a vantagem de não oferecer risco ao operador. A demonstração de que o sorovar saprófita Patoc era capaz de reagir com anticorpos contra leptospirosas patogênicas fez com que esta cepa fosse amplamente utilizada em testes diagnósticos para leptospirose humana^{22,28-30}. No presente estudo, o MAT-Patoc foi reagente em amostras de casos cujos prováveis sorogrupos infectantes foram *Icterohaemorrhagiae*, *Cynopteri* e *Ballum*. Assim, o MAT-Patoc pode ser utilizado na triagem de casos de leptospirose já que reage com diferentes sorovares, principalmente os pertencentes ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* que é o mais prevalente em nosso meio³¹⁻³³.

Tabela 2. Positividade dos testes MAT-Patoc e ELISA-IgM de acordo com o número de dias após o início dos sintomas

Dias após o início dos sintomas	Nº de amostras	Positividade	
		MAT-Patoc (%)	ELISA IgM (%)
1-7	122	15 (12,29)	30 (24,59)
8-14	32	6 (18,75)	14 (43,75)
15-22	3	0 (0)	1 (33,30)
≥23	1	0 (0)	0 (0)
Total	158	21 (13,29)	45 (28,48)

De acordo com Levett¹, os anticorpos IgM tornam-se detectáveis durante a primeira semana da doença, porém ainda em concentrações relativamente baixas. Apesar do ELISA-IgM ter apresentado sensibilidade maior que o MAT-Patoc, a positividade de ambos os testes foi baixa, provavelmente pelo fato de os anticorpos não estarem presentes em quantidades suficientes para a detecção por essas metodologias na fase aguda da doença.

Sehgal et al³⁴ reportaram uma sensibilidade do MAT de 41 % nas amostras coletadas durante a primeira semana de doença aumentando para 82 % nas amostras coletadas entre a segunda e a quarta semana e 96 % após a quarta semana de doença. Os autores também observaram que algumas amostras negativas para o MAT, coletadas até a quarta semana de doença, tornaram-se positivas em outra amostra obtida após 30 dias do início dos sintomas, confirmando a necessidade de pelo menos duas amostras pareadas de soro para o diagnóstico correto da leptospirose.

No presente estudo, o teste de MAT-Patoc apresentou menor sensibilidade em relação ao ELISA-IgM, com valores de 13,29 % e 28,48 %, respectivamente. Quando amostras com coleta até o 7º dia após o início dos sintomas foram analisadas, a positividade do MAT-Patoc também foi inferior ao do teste de ELISA-IgM sendo de 12,29 % e 24,59 %, respectivamente. Entretanto, por apresentar alguns resultados reagentes, inclusive com ELISA-IgM não reagentes, o MAT-Patoc pode auxiliar na detecção precoce da doença, aumentando ainda mais as chances de detecção se utilizado junto com o teste de ELISA-IgM.

Quando o teste de MAT é realizado em uma única amostra de paciente com suspeita de leptospirose e não há possibilidade de coleta de mais amostras, um título ≥ 800 confirma o diagnóstico¹. Os títulos apresentados pelo MAT-Patoc foram baixos, variando de 50 a 200, não sendo possível a confirmação por esse teste de nenhum dos casos deste estudo utilizando apenas uma amostra.

Em conclusão, para o diagnóstico precoce da leptospirose, o teste MAT-Patoc apresentou resultados reagentes em amostras colhidas na fase aguda da doença, inclusive em amostras com resultado não reagente no teste de ELISA IgM, apesar de ter sido menos sensível do que este. Esses resultados evidenciam a necessidade de mais de um teste de triagem. É importante ressaltar que o MAT, método de referência recomendado pela OMS, deve ser utilizado para confirmação de diagnóstico.

REFERÊNCIAS

1. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296-326. [DOI: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001].
2. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:757-71. [DOI: 10.1016/S1473-3099(03)00830-2].
3. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2ª ed. Melbourne (Australia): MediSci; 1999.
4. Adler B, Faine S, Christopher WL, Chappel RJ. Development of an improved selective medium for isolation of leptospire from clinical material. *Vet Microbiol*. 1986;12:377-81. [DOI: 10.1016/0378-1135(86)90087-8].
5. Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, Smythe LD, Symonds ML, Dohnt MF et al. Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2007;45(4):1363-5. [DOI: 10.1128/JCM.02430-06].
6. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwal AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*. 2005;54:45-9.
7. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS One*. 2009;4(9):e7093. [DOI: 10.1371/journal.pone.0007093].

8. Bedir O, Kilic A, Atabek E, Kuskucu AM, Turhan V, Basustaoglu AC. Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. by Multiplex Real-Time PCR (TaqMan) assay. *Pol J Microbiol*.2010;59(3):167-73.
9. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol*.2011;49(6):2154-60. [DOI: 10.1128/JCM.02452-10].
10. Blanco RM, Romero EC. Evaluation of nested polymerase chain reaction for the early detection of *Leptospira* spp. DNA in serum samples from patients with leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*.2014;78(4):343-6. [DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.009].
11. Ministério da Saúde do Brasil. Portal da Saúde. 2015. [acesso 2015 Mar 16]. Disponível em: [http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas].
12. World Health Organization/International Leptospirosis Society. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. [acesso 2014 Out 10]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf].
13. Marta AG. Leptospirosis: Public health perspectives. *Biologicals*.2013;41:295-7. [DOI: 10.1016/j.biologicals.2013.06.010].
14. Smits HL, Ananyina YV, Chereshsky A, Dancel L, Lai-A-Fat RFM, Chee HD, et al. International Multicenter Evaluation of the clinical utility of a Dipstick Assay for detection of *Leptospira*-Specific Immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. *J Clin Microbiol*.1999;37:2904-9.
15. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3303-10. [DOI: 10.1128/JCM.39.9.3303-3310.2001].
16. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):803-9. [DOI: 10.1128/JCM.41.2.803-809.2003].
17. Tahiliani P, Kumar MM, Chandu D, Kumar A, Nagaraj C, Nandi D. Gel purified LipL32: A prospective antigen for detection of leptospirosis. *J Postgrad Med*.2005;51:164-8.
18. McBride AJA, Pereira FA, Silva ED, Matos RB, Silva ED, Ferreira AGP, et al. Evaluation of the EIE-IgM-Leptospirose assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *Acta Trop*. 2007;102(3):206-11. [DOI: 10.1016/j.actatropica.2007.05.002].
19. Tanganuchitcharnchai A, Smythe L, Dohnt M, Hartskeerl R, Vongsouvath M, Davong V et al. Evaluation of the Standard Diagnostics *Leptospira* IgM ELISA for diagnosis of acute leptospirosis in Lao PDR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.2012;106(9):563-6. [DOI: 10.1016/j.trstmh.2012.06.002].
20. Addamiano L, Babudiaeri B. Water strains of *Leptospira* in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. *Bull World Health Organ*.1968;39(6):925-34.
21. Corrêa MO, Natale V, Sadatsune T, Fleury GC. Practical value and use of Patoc I *Leptospira* semaranga in the diagnosis of human leptospirosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*.1970;12(4):284-7.
22. Girio RJS, Mathias LA. Use of saprophytic *Leptospira* strains in the serodiagnosis of experimental leptospirosis in guinea-pigs (*Cavia* sp). *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 988;30(2):91-4. [DOI: 10.1590/S0036-46651988000200007].
23. Ahmad SN, Shah SH, Ahmad FM. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Postgrad Med*. 2005;51:195-200.
24. Blanco RM, Takei K, Romero EC. Leptospiral glycolipoprotein as a candidate antigen for serodiagnosis of human leptospirosis. *Lett Appl Microbiol*.2009;49(2):267-73. [DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02650.x].

25. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.*2008;33:557-69.
26. Helmerhorst HJ, Van Tol EN, Tuinman PR, de Vries PJ, Hartskeerl RA, Grobusch MP et al. Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. *Neth J Med.*2012;70(5):215-21.
27. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.*2009;64(3):247-55. [DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014].
28. Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. ELISA for the Detection of Specific IgM and IgG in Human Leptospirosis. *J Gen Microbiol.*1985;131:377-85.
29. Cumberland P, Everard COR, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and Microscopic Agglutination Test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.*1999;61(5):731-4.
30. Levett PN, Branch SL. Evaluation of two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Methods for detection of Immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(6):745-8.
31. Sakata EE, Yasuda PH, Romero EC, Silva MV, Lomar AV. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1992;34:217-21. [DOI: 10.1590/S0036-46651992000300006].
32. Romero EC, Bernardo CCM, Yasuda PH. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2003;45(5): 245-48. [DOI: 10.1590/S0036-46652003000500002].
33. Romero EC, Blanco RM, Galloway RL. Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. *Lett Appl Microbiol.*2009;48:623-7. [DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02580.x].
34. Sehgal SC, Vijayachari S, Sharma S, Sugunan AP. LEPTO Dipstick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93:161-4.