

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE BOVINA

STANDARDIZATION AND VALIDATION OF ELISA FOR DIAGNOSIS OF BOVINE LEPTOSPIROSIS

Mariana Assunção de SOUZA¹; Jacqueline Ribeiro de CASTRO¹;
Tatiane Cristina Fernandes TAVARES¹; Pollyanna Mafra SOARES¹;
Mariane Pacheco dos SANTOS¹; Higor Oliveira SILVA¹;
Anna Monteiro Correia LIMA-RIBEIRO²

1. Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Faculdade de Medicina Veterinária - FAMEV, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, MG, Brasil. mari_assuncao@yahoo.com.br; 2. Professora, Doutora, FAMEV – UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

RESUMO: A leptospirose é uma zoonose que causa sérios danos à saúde dos animais. Por se tratar de uma das doenças de maior impacto econômico, o correto diagnóstico e vigilância epidemiológica são fundamentais para o controle da infecção. Objetivou-se padronizar e validar o teste de ELISA indireto empregando proteínas de membrana externa (PME) do sorovar Hardjo como antígeno (ELISA-PME/Hardjo), tendo o teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) como referência. O ELISA-PME/Hardjo foi padronizado utilizando-se amostras de soro de 15 bovinos positivos e 15 negativos no exame de SAM. A PME/Hardjo foi avaliada nas concentrações de 0,35 µg/µL, 0,17 µg/µL, 0,08 µg/µL e 0,04 µg/µL. As amostras de soro foram testadas nas diluições 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000, e o conjugado anti IgG 1:5000 e 1:10000. A validação do teste foi feita utilizando-se 218 amostras de soro bovino. A padronização do ELISA-PME/Hardjo indicou que a melhor concentração protéica para sensibilização da placa foi de 0,08 µg/µL, diluição do anticorpo primário 1:50 e do conjugado anti-IgG 1:5000. Das 218 amostras submetidas ao teste de SAM, 86 (39%) foram positivas, e 132 (61%) negativas. Já o ELISA-PME/Hardjo identificou 121 (55%) amostras positivas e 97 (45%) negativas. A sensibilidade foi de 100% e especificidade 73%. A comparação dos testes de SAM e ELISA demonstrou concordância de 0,83% e índice *Kappa* de 0,68 ($p < 0,0001$). O ELISA-PME/Hardjo mostrou ser um teste sensível, indicando seu uso potencial como exame de triagem no diagnóstico da leptospirose bovina.

PALAVRAS-CHAVE: *Leptospira* spp. Proteínas de Membrana Externa. Soroaglutinação Microscópica

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, que acomete grande parte das espécies animais, inclusive o ser humano (QUINN et al., 2005). Causada por espécies patogênicas de bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*, o qual atualmente é composto por 19 espécies e mais de 300 sorovares (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

No Brasil, as pesquisas indicam que *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo é o mais detectado em bovinos e que este seja o agente etiológico que cause maior impacto econômico na eficiência reprodutiva nos rebanhos da espécie bovina (MOREIRA, 1994).

O teste diagnóstico recomendado pela Organização Mundial de Saúde é a Soroaglutinação Microscópica (SAM). Este exame possui baixa sensibilidade, especialmente na fase inicial da doença (WHO, 2003; McBRIDE et al., 2005). A necessidade de se cultivar um grande número de leptospirosas vivas potencialmente patogênicas é

arriscado, tal fato tem sido apontado como a principal limitação para o emprego do teste, além de necessitar de um técnico especializado e treinado para proceder a leitura em microscopia de campo escuro (BLANCO, 2007; BOMFIM et al., 2005).

Inconvenientes na maioria dos testes sorológicos levaram ao desenvolvimento de alternativas, tais como a reação de hemaglutinação indireta, a contraimunoeletroforese e o teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (EL JALLI, 2008). Diferentes porções antigênicas têm sido utilizadas na realização do ELISA para o diagnóstico da leptospirose. Várias metodologias de extração e purificação antigênica já foram empregadas, na tentativa de se obter um antígeno específico e de melhor sensibilidade (PRIYA et al., 2003; SURUJBALLI; MALLORY, 2004; TOMICH et al., 2007; BLANCO, 2007).

Atualmente sabe-se que existem várias proteínas expostas na superfície de membrana da bactéria, e que assim como o lipopolissacarídeo (LPS), são capazes de estimular respostas imunes e

por isso são alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico (CULLEN et al., 2002; CULLEN et al., 2005).

Por ser uma das doenças de maior impacto econômico, o correto diagnóstico e vigilância epidemiológica são fundamentais para se estabelecer um controle efetivo da disseminação do agente. Objetivou-se padronizar e validar o teste de ELISA indireto empregando proteínas de membrana externa (PME) do sorovar Hardjo como antígeno (ELISA-PME/Hardjo), tendo o teste de Soroaglutinação Microscópica como referência.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Duzentos e quarenta e oito amostras de soro bovino foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Produção do Antígeno (PME/Hardjo)

A *L. interrogans* sorovar Hardjo foi cultivada em meio líquido de Ellinghausen - McCullough - Johnson - Harris (EMJH - DIFCO), acrescido com 10% de soro estéril de coelho livre de anticorpos antileptospira, e incubado por sete dias a 30°C (BRASIL, 1995).

A extração foi realizada a partir de 50 mL de meio de cultura, utilizando-se o detergente Triton X114 (HAAKE et al., 1991) e as proteínas extraídas foram precipitadas com acetona (CUNNINGHAM et al., 1988). Em seguida a amostra foi centrifugada a 12.600 x g por 30 minutos a 4°C, e a acetona presente no sobrenadante descartada. O *pellet* foi ressuspendido em 500 µL de água ultrapura e estocado a -20°C. A concentração protéica foi avaliada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A leitura foi realizada a 595 nm, em espectrofotômetro Ultraspec- 1000 (Pharmacia, Biotech®).

Padronização do ELISA-PME/Hardjo

O teste de ELISA-PME/Hardjo foi padronizado como recomendado pela FAO/OIE (WRIGHT et al., 1993; MADRUGA et al., 2001), sendo realizado a partir de modificações descritas (TOMICICH et al., 2007).

Utilizou-se 30 amostras de soro bovino, sendo 15 positivas, obtidas de bovinos com leptospirose comprovada clínica e laboratorialmente pela SAM. A suspeita clínica foi baseada em problemas reprodutivos como, repetição de cio e aborto, nascimento de bezerros fracos ou

mumificados. Estes animais não tinham histórico de vacinação contra leptospirose; e 15 amostras de soro negativo obtidas de bezerros sadios com até três meses de idade, não vacinados para leptospirose, sem antecedentes clínico epidemiológicos e laboratorialmente negativos no teste de SAM.

Para este ensaio, foram realizadas titulações em triplicata com as amostras de soro e com conjugado anti IgG bovino Peroxidase (Sigma®).

Para avaliar a melhor concentração do antígeno na sensibilização da placa de ELISA, a PME/Hardjo foi analisada em quatro concentrações: pura (0,35 µg/µL), diluída 1:2 (0,17 µg/µL), 1:4 (0,08 µg/µL) e 1:8 (0,04 µg/µL). As amostras de soro foram diluídas para ambos os conjugados a 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1.000, e o conjugado anti IgG foi diluído a 1:5.000 e 1:10.000.

Após a padronização da técnica, as amostras foram testadas individualmente em duplicata, sendo os resultados expressos em densidade óptica (DO). O ponto de corte foi determinado pela soma das médias de DO das amostras negativas acrescidos de dois desvios padrão (MADRUGA et al., 2001).

Validação do ELISA-PME/Hardjo

Para validação empregou-se 218 amostras de bovinos de ambos os sexos com idade entre três a seis anos, sem histórico de vacinação e com manifestações clínicas sugestivas ou não de leptospirose.

A placa de microtitulação de poliestireno (Nunc MaxiSorp®) foi sensibilizada com 100 µL/poço do antígeno (PME/Hardjo) na concentração de 0,08 µg/µL (PME/Hardjo diluída 1:4) em tampão carbonato bicarbonato (0,05M pH 9,6), durante 14h a 4°C em câmara úmida. Em seguida as placas foram lavadas manualmente com auxílio de micropipeta automática por três vezes com (PBS 0.01M pH 7.4) e adicionado 200 µL de solução de bloqueio PBS-M (leite em pó desnatado na concentração de 5%, diluído em PBS) e incubado durante 1h a 37°C. Após novas lavadas, foi distribuído em duplicata 100 µL de soro dos bovinos, diluído a 1:50 em PBS-TM (PBS-M com 0,05% (v/v) de Tween 20) durante 1h a 37°C.

As placas foram novamente lavadas com PBS-T (PBS com 0,05% (v/v) Tween 20) e 100 µL do conjugado diluído 1:5000 em PBS-TM foi adicionado durante 1 hora a 37°C. Após novos processos de lavagem a reação foi revelada pela adição de 100 µL/poço de OPD (Ortofenilenodiamino - Dako®) acrescido de H₂O₂. Após 15 min à temperatura ambiente, sem exposição da luz, a reação foi interrompida com adição de 25 µL de solução de H₂SO₄ 4N. A

reatividade foi avaliada através das leituras de DO determinadas no comprimento de onda de 492 nm em leitor de ELISA (TP Reader –Thermoplate®).

Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM)

O teste de SAM foi realizado sendo considerados positivos as amostras de soro dos bovinos reagentes a partir da diluição 1:100 (FAINE et al., 1999). Utilizou-se como antígeno culturas vivas de 14 sorovares de leptospira, representando 11 sorogrupos de *L. interrogans*.

Análise Estatística

Para determinação da eficiência do teste ELISA-PME/Hardjo foram calculados os valores relativos de sensibilidade e especificidade (THRUSFIELD, 2004) tendo como referência os

resultados obtidos pela SAM. O grau de concordância foi medido pelo índice *Kappa* (FERREIRA; ÁVILA, 2001), utilizando-se o Programa Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007).

RESULTADOS

A padronização do ELISA-PME/Hardjo indicou que a melhor concentração protéica para sensibilização da placa foi de 0,08 µg/µL (PME/Hardjo diluída 1:4), diluição do anticorpo primário 1:50 e do conjugado anti-IgG 1:5000.

A concentração do antígeno e a diluição (conjugado e soro) ideal foi a que apresentou a maior diferença em DO entre amostras de soro positivo e negativo (MADRUGA et al., 2001) (Figura 1).

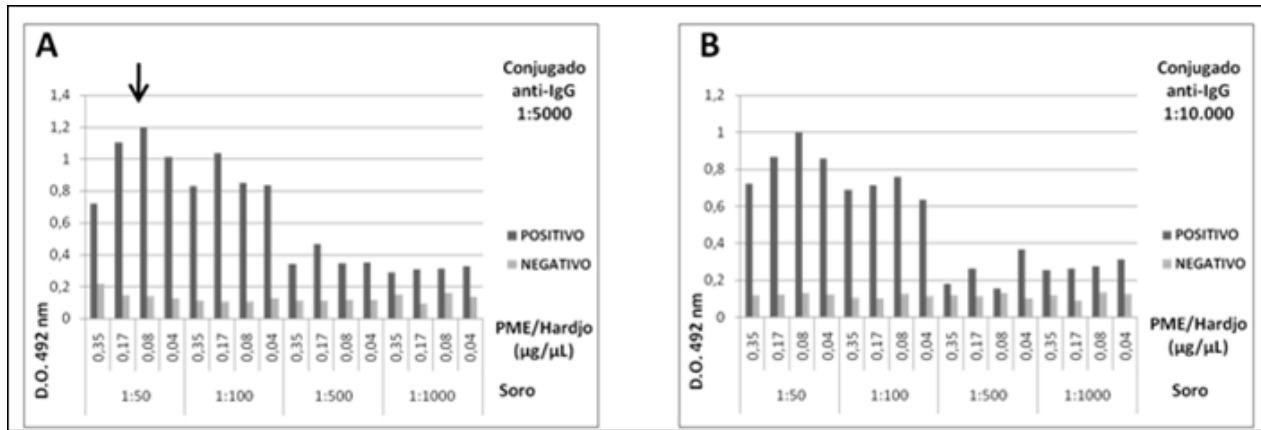


Figura 1. Padronização do ELISA- PME/Hardjo A – Média da DO das amostras de soro nas diluições de 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1.000, conjugado anti IgG bovino diluído 1:5000 e antígeno (PME/Hardjo) na concentração de 0,35 µg/µL; diluído 1:2 (0,17µg/µL), 1:4 (0,08 µg/µL) e 1:8 (0,04 µg/µL). B – Média da DO das amostras de soro nas diluições de 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000, conjugado anti IgG bovino diluído 1:10000 e antígeno (PME/Hardjo) na concentração de 0,35 µg/µL; diluído 1:2 (0,17µg/µL), 1:4 (0,08 µg/µL) e 1:8 (0,04 µg/µL). Obs. A seta indica a melhor condição para realização do teste.

As amostras de soro negativo utilizadas na padronização quando testadas individualmente obtiveram DO média de 0,147 com desvio padrão de 0,048. O ELISA-PME/Hardjo teve ponto de corte de 0,244. Enquanto que as amostras de soro dos bovinos reagentes para leptospirose tiveram DO média de 0,899 e desvio padrão de 0,231. Nenhuma amostra positiva obteve DO média abaixo do ponto de corte do teste (Figura 2).

Observou-se que, das 218 amostras utilizadas para validação do ELISA-PME/Hardjo, 121 (55%) foram positivas e 97 (45%) negativas. Quando comparado o teste de ELISA com a SAM, 121 (55%) foram positivas no ELISA enquanto que

86 (39%) foram positivas na SAM. Nenhuma amostra positiva na SAM foi negativa no ELISA. 35 (16%) amostras foram positivas no ELISA e negativas na SAM (Tabelas 1 e 2).

A sensibilidade foi de 100% e especificidade 73%. A comparação dos testes de SAM e ELISA-PME/Hardjo demonstrou concordância de 83% e índice *Kappa* de 0,68 ($p < 0,0001$). A concordância observada na análise do *Kappa* é significativa e sugere que a diferença observada entre os resultados obtidos nos testes, não ocorreram ao acaso, classificando a replicabilidade do teste como substancial.

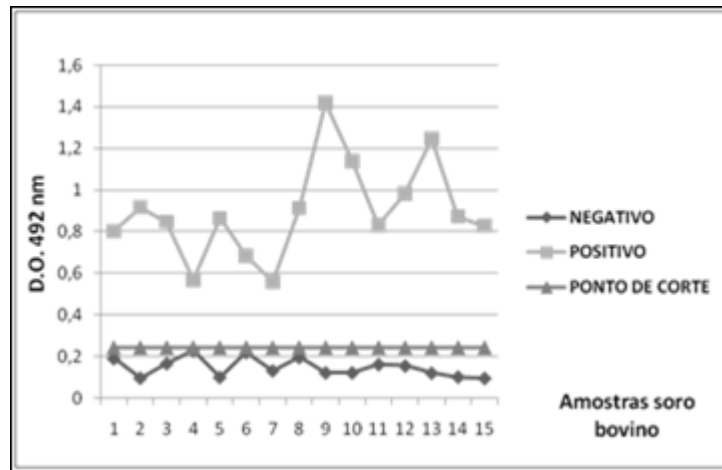


Figura 2. Representação gráfica dos valores de DO obtidos no ELISA-PME/Hardjo. Amostras de soro na diluição 1:50, PME/Hardjo na concentração de 0,08µg/µL e conjugado anti IgG bovino 1:5000.

Tabela 1. Resultado das 218 amostras de soro bovino pelos testes de SAM e ELISA-PME/Hardjo para o diagnóstico sorológico da leptospirose bovina

	Pos	%	Neg	%	Total
SAM	86	39	132	61	218
ELISA*	121	55	97	45	218

* Pos (D.O > 0,244); Neg (D.O < 0,244)

Tabela 2. Comparação dos resultados das amostras de soro bovino testados pela SAM e pelo ELISA-PME/Hardjo para o diagnóstico sorológico da leptospirose bovina

ELISA/PME	SAM		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	86	35	121
Negativo	0	97	97
Total	86	132	218

Sensibilidade = 100 % Especificidade = 73% Concordância = 83% Kappa = 0,68

DISCUSSÃO

Obteve-se a partir da padronização do ELISA-PME/Hardjo um protocolo capaz de ter um bom rendimento dos principais componentes da reação (antígenos e conjugados) com boa resolução. A concentração ótima do antígeno de 0,08 µg/µL permite teoricamente, a realização de 1.500 testes com a quantidade de proteína extraída a partir de 50 mL de meio de cultura.

De acordo com a (Figura 2), das amostras utilizadas na padronização, observou-se que houve sempre o mesmo padrão das amostras de soro negativo, apresentando baixa reatividade com as proteínas de membrana de leptospira. Nenhum animal reagente na SAM teve DO média abaixo do ponto de corte. O desvio padrão de 0,231 entre os

bovinos reagentes pode ser explicado pela diferença nos títulos da infecção. Os bovinos 4, 6 e 7, os quais obtiveram valores de DO menores, apresentaram títulos inferiores a 1:400 no teste de SAM. Os demais bovinos positivos apresentaram titulação superior a 1:400, sendo que o animal 9 reagiu até a diluição de 1:800.

A maior parte das pesquisas com antígeno de leptospira direcionam seus estudos ao LPS (BLANCO, 2007). A utilização dessa estrutura nos testes de ELISA apresenta algumas limitações conforme verificado por (PRIYA et al., 2003) que ao utilizarem LPS de *L. biflexa* sorovar Patoc, obtiveram sensibilidade de apenas 48%. Os autores atribuíram a baixa sensibilidade ao fato do LPS ser sorovar específico e sugerem que a utilização de

LPS de diferentes sorovares aumentaria a sensibilidade do teste.

A utilização de PME como antígeno deste estudo, deve-se ao fato de que ao contrário do LPS, essas estruturas mostram-se conservadas entre os diversos sorovares de *L. interrogans* (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001), sendo que as proteínas de membrana externa do sorovar Hardjo possui muitas similaridades com o perfil protéico da membrana externa das outras soro variedades de *L. interrogans* (LAFETÁ et al., 2008).

A sensibilidade do ELISA-PME/Hardjo foi máxima (100%). Bomfim et al. (2005) e Tomich et al. (2007) também verificaram alta sensibilidade, 100% e 99,30% respectivamente, ao utilizarem como antígeno a LipL32, um dos principais componentes de membrana das leptospiras (CULLEN et al., 2002).

Das 218 amostras 97 foram positivas na SAM e 121 no ELISA-PME/Hardjo. Resultados de outras pesquisas (SURUJBALLI; MALLORY, 2004; TOMICH et al., 2007; EL JALLI, 2008), demonstram uma tendência dos testes de ELISA em reconhecer maior número de animais reagentes quando comparados ao exame de SAM. Tomich et al. (2007) verificaram 143 amostras positivas na SAM, e 161 no ELISA, enquanto que El Jalli (2008) obteve 47 positivos na SAM e 196 no ELISA.

A sensibilidade de 100% e especificidade de 73% não significa necessariamente alta ocorrência de resultados falso positivos. Sugere-se que os animais reagentes no ELISA e negativos na SAM poderiam estar infectados para outros sorovares os quais não foram testados na SAM, ou ainda que o teste de ELISA-PME/Hardjo poderia estar reconhecendo animais em início de infecção. Além disso, a leitura da SAM é subjetiva na dependência da avaliação de cada técnico, sendo que o animal poderia estar positivo, mas interpretou-se como negativo.

A avaliação da concordância entre os exames, foi feita por meio do índice *Kappa*, que varia de 0 a 1, sendo 1 a expressão da exata concordância entre os testes. O ELISA-PME/Hardjo apresentou índice interpretado como substancial ($p < 0.0001$) o que significa haver concordância nos resultados obtidos pelos dois testes de diagnóstico realizados.

A alta sensibilidade do ELISA-PME/Hardjo obtida neste estudo indica o potencial das proteínas de membrana do sorovar Hardjo serem aplicadas no diagnóstico de triagem da leptospirose bovina. Por ser uma técnica com elevado nível de sensibilidade, reprodutibilidade e permitir automação, o ELISA é um método de eleição para exame de um grande número de amostras (TIZARD, 2002). Entre as vantagens do ELISA em relação à Soroaglutinação Microscópica estão à estabilidade e o pequeno volume de reagentes, o baixo nível de risco biológico, interpretação objetiva dos resultados possibilita rápida execução, e pode ser também usada para estudos epidemiológicos (BOMFIM et al., 2005, RADOSTITS et al., 2002).

CONCLUSÕES

A padronização do ELISA-PME/Hardjo permitiu um protocolo capaz de ter um bom rendimento dos principais componentes da reação (antígenos e conjugados) com boa resolução.

O ELISA-PME/Hardjo mostrou ser um teste sensível, indicando seu uso potencial como exame de triagem no diagnóstico da leptospirose bovina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. À CAPES e ao CNPq.

ABSTRACT: Leptospirosis is a zoonotic disease that causes serious health risks to animals. It is a disease of high economic impact, therefore the correct diagnosis and surveillance are essential to control infection. The aim of this study was to standardize and validate an indirect ELISA using outer membrane proteins (OMPs) of serovar Hardjo as the antigen of the test (ELISA-OMP/Hardjo), using the microscopic agglutination test (MAT) as a reference. The ELISA-OMP/Hardjo was standardized using 15 serum samples from positive animals and 15 negative in the MAT. The OMP / Hardjo was evaluated at concentrations of 0.35 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$, 0.17 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$, 0.08 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ and 0.04 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$. Serum samples were tested at dilutions 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, and anti IgG conjugate in 1:5000 and 1:10000. The validation of the test was performed using 218 serum samples. The standardization of ELISA-OMP/Hardjo indicated that the best protein concentration for sensitization of the plate was 0.08 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$, 1:50 dilution of primary antibody and conjugated anti-IgG 1:5000. Of the 218 samples tested in MAT, 86 (39%) were positive and 132 (61%) negative. ELISA-OMP/Hardjo already identified 121 (55%) positive samples and 97 (45%) negative. The sensitivity was 100% and specificity 73%. Comparison of MAT and ELISA tests showed concordance of 0.83% and Kappa of 0.68 ($p < 0.0001$). The ELISA-OMP/Hardjo proved to be a sensitive test, indicating its potential as a screening tool in the diagnosis of bovine leptospirosis.

KEYWORDS: *Leptospira* spp. Outer Membrane Proteins (OMPs). Microscopic Agglutination Test.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3/4, p. 287-296, 2010.
- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **Bioestat 6.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. 6 ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, MCT – CNPq. 2007. 324p
- BLANCO, R. M. **Avaliação da glicoproteína como antígenos para sorodiagnóstico da leptospirose**. 2007. 75f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BOMFIM, M. R. Q.; KO, A.; KOURY, M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 1/2, p. 89-94, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde**. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Manual de Leptospirose. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98 p.
- CULLEN, P. A.; CORDWELL, S. J.; BULACH, D. M.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Global analysis of outer proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2311-2318, 2002.
- CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 8, p. 4853-4863, 2005.
- CUNNINGHAM, T. M.; WALKER, E. M.; MILLER, J. N.; LOVETT, M. A. Selective release of *Treponema pallidum* outer membrane and associated polypeptides with triton x-114. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 12, p. 5789-5796, 1988.
- EL JALLI, I. M. Comparison between ELISA and the Microscopic Agglutination Test for the Diagnosis of Bovine Leptospirosis. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, Montpellier, v. 61, n. 2, p. 73-75, 2008.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLA, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2º Edition. Melbourne: Austrália, MediSci, 1999. 296p.
- FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Sorologia: importância e parâmetros. In: **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes**, 2ª Edição, Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, p. 1-8, 2001.
- HAAKE, D. A.; WALKER, E. M.; BLANCO, D. R.; BOLIN, C. A.; MILLER, M. N.; LOVETT, M. A. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa during "in vitro" cultivation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, n. 3, p. 1131-1140, 1991.

- LAFETÁ, B. N.; SANTOS, S.; SILVA, V. L.; CARVALHO, M. A. R.; DINIZ, C. G.; SILVA, N. Determinação do perfil protéico da membrana externa da *Leptospira interrogans* sorovariedade Hardjoprajitno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 6, p. 1301-1306, 2008.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**, Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.
- MCBRIDE, A. J. A.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis, **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.
- MOREIRA, E. C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros**. 1994. 93f. Tese (Doutorado em Ciências Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.
- PRIYA, C. G.; BHAVANI, K.; RATHINAM, S. R.; MUTHUKKARUPPAN, V. R. Identification and evaluation of LPS antigen for serodiagnosis of uveitis associated with leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 52, n. 8, p. 667-673, 2003.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**, Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 530 p.
- SURUJBALLI, O. P.; MALLORY, M. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine anti-bodies to multiple *Leptospira* serovars. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 68, n. 1, p. 1-6, 2004.
- THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**, São Paulo: Editora Roca, 2004. 556 p.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**, 6 ed., São Paulo: Roca, 2002. 532 p.
- TOMICH, R. G. P.; BOMFIM, M. R. Q.; KOURY, M. C.; PELLEGRIN, A. O.; PELLEGRIN, L. A.; KO, A. I.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Leptospirosis serosurvey in bovines from brazilian pantanal using IgG ELISA with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 674-680, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Human leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva: World Health Organization/ Internacional Leptospirosis Society, 2003. 109p.
- WRIGHT, P. F.; NILSSON, E.; VAN ROOIJ, E. M. A.; LELENTA, M.; JEGGO, M. H. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, Paris, v. 12, n. 2, p. 435-450, 1993.