

Trabajo completo

Evaluación de desempeño de un test de ELISA desarrollado por el grupo ANLIS–UNL

RECIBIDO: 28/06/2013

ACEPTADO: 08/10/2013

Simil, E.¹ • Lottersberger, J.¹ • Vanasco, N.B.^{1,2}

¹ Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL), Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo – CC 242, 3000, Santa Fe, Argentina.

Tel: +54–342–4575215 / 216 / 209 / 206. Fax: 342–4575221.

E–mail: edisimil@gmail.com

² INER – Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. ANLIS;

Ministerio de Salud de la provincia de Santa Fe. Blas Parera 8260,

3000, Santa Fe, Argentina. Tel/Fax: +54–342–4892827 / 4896851.

E–mail: bibi_vanasco@hotmail.com

RESUMEN: La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de amplia distribución mundial. Las técnicas diagnósticas de referencia, la microaglutinación (MAT) y el aislamiento, son complejas, anticuadas y no permiten la detección temprana de los casos. Por ello, es necesario desarrollar y evaluar la utilidad de nuevos métodos diagnósticos. El objetivo de este estudio fue evaluar el desempeño de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) IgG (Kit prototipo) desarrollado por el grupo ANLIS–UNL.

La sensibilidad analítica hallada fue $\geq 1:3.200$ y por lo tanto muy superior al 1:50 de la MAT. En la evaluación de la especificidad analítica no se detectaron interferencias debido a hiperlipemia, hipergamaglobulinemia, hiperbilirrubinemia ni hemólisis. En los estudios de

envejecimiento acelerado los controles positivos fueron los únicos componentes que se deterioran a partir de las 24hs a 37 °C, por ello el Kit debe transportarse refrigerado y llegar a destino antes de transcurrido este tiempo. La sensibilidad y especificidad diagnóstica del Kit Prototipo ELISA IgG fue buena, sumados a la gran estabilidad, repetitividad y reproducibilidad de sus resultados, indicarían que constituye una nueva herramienta para el diagnóstico de los casos de leptospirosis a ser aplicada en éste u otros países.

PALABRAS CLAVE: Leptospirosis, Test de ELISA, Serodiagnóstico.

SUMMARY: *Performance evaluation of an ELISA test developed by the ANLIS–UNL group*

Leptospirosis is one of the major zoonotic diseases worldwide. Diagnosis techniques such as reference, microagglutination (MAT) and isolation are complex, out-of-date, and fail to achieve early case detection. It is thus necessary to develop and assess the utility of new diagnosis methods. The goal of this study was to assess the performance of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) developed by the ANLIS-UNL group. An analytic sensitivity of $\geq 1:3.200$ was found, hence much larger than MAT's 1:50. No interference associated with hyperlipidemia, hypergammaglobulinemia, or haemolysis was detected in the analytic specificity assessment. None of the components decayed under top preservation conditions and fridge (4–10

°C) until their year of production. In the accelerated ageing studies, positive controls were the only components to decay after 24 hours at 37 °C. Therefore, the kit should remain cool while transported and be on site before this interval is complete. It should never be frozen since the chromogenic substrate becomes ineffectual, as shown in the insert. The ELISA IgG Prototype kit diagnosis sensitivity and specificity was good. Moreover, the great stability, repeatability and reproducibility of results would suggest that it is a new leptospirosis case diagnosing tool to be applied in this and other countries.

KEYWORDS: Leptospirosis, ELISA, Serodiagnosis.

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por espiroquetas que tiene una amplia distribución mundial (1). Afecta tanto a seres humanos como a los animales siendo el hombre un hospedero accidental que adquiere la infección directamente por contacto de la piel o mucosas con orina, sangre o tejidos de animales infectados. Indirectamente, puede ser, a través del contacto con agua o suelo húmedo, contaminado por orina de animales infectados (2). Se destaca por su diversidad clínica puede manifestar como una infección asintomática, hasta desarrollar manifestaciones hemorrágicas y asociarse con síndrome meníngeo, ictericia e insuficiencia renal (3). Adicionalmente, en los últimos años existe una emergencia global del

Síndrome de Hemorragia Pulmonar severa (SHPS) cuya mortalidad supera el 50 % (4).

Aunque la enorme mayoría de los casos de leptospirosis afectan a las provincias de Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires, en los últimos años ya se han registrado casos en casi todas las provincias del país, e incluso también en la Patagonia (6, 7, 8, 9).

Un diagnóstico confiable y precoz es imprescindible para comenzar inmediatamente una antibioticoterapia efectiva que prevenga la evolución hacia formas graves de la enfermedad (10). Las técnicas diagnósticas de referencia para leptospirosis, la microagglutinación (MAT) y el aislamiento, son complejas, anticuadas y no permiten la detección temprana de los casos. El diagnóstico de leptospirosis, se basa generalmente en la MAT, éste método requiere

muestras pareadas de sueros y utilización de microscopía de campo oscuro para la observación de reacciones de aglutinación con leptospiras vivas (11, 12, 13). La ineficiencia de la MAT es una de las principales razones de la falta de diagnóstico oportuno y precoz, aunque esta técnica continúa siendo el método patrón serológico (14). El método de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente, conocido como TR, es una prueba género específica (detecta anticuerpos anti-leptospiras) y su producción artesanal se realiza en muy pocos laboratorios de referencia. En la mayoría de los laboratorios de salud pública de Argentina el cribado o tamiz diagnóstico aún se realiza mediante el TR. A pesar de la amplia utilización del TR en nuestro país y de sus ventajas estratégicas, tiene numerosas limitaciones. Una de sus desventajas operativas es su subjetividad, no es fácil de visualizar, y requiere de muestras límpidas y bien conservadas.

Por todas las limitaciones de los métodos disponibles es necesario desarrollar y evaluar la utilidad de nuevos ensayos de diagnóstico rápido que puedan realizarse en laboratorios de baja complejidad que puedan ser aplicados en este u otros países. El objetivo de este estudio fue evaluar el desempeño de un enzoinmunoensayo (ELISA) IgG (Kit prototipo) desarrollado por el grupo ANLIS-UNL.

Materiales y métodos

• Diseño

Es un estudio cuantitativo de evaluación. Se hizo una validación y evaluación retrospectiva del ELISA desarrollado por ANLIS-UNL como prueba de diagnóstico serológico de tamiz, mediante diseños de

experimentos y análisis y mediciones de laboratorio.

• Población y muestra

Universo o población objetivo

El universo donde se pretenden extrapolar los resultados de este estudio son todos los pacientes con sospecha de leptospirosis a nivel nacional o en países de la región.

Unidad de análisis, criterios de inclusión y exclusión

La variable discriminante fue el criterio de definición de casos que se describe a continuación.

La confirmación de casos se hizo de acuerdo a las pruebas patrón (Microaglutinación (MAT) y aislamiento cuando éste fue posible) y antecedentes de laboratorio clínico general, síntomas clínicos y datos epidemiológicos.

“Casos confirmados”: fueron los pacientes con antecedentes clínicos y epidemiológicos compatibles, donde fue demostrada: a) seroconversión a la MAT (aumento de título en al menos cuatro veces para un serovar) en dos el más muestras con al menos una semana de diferencia entre ellas, b) una única muestra positiva para más de un serovar (co-aglutinación) con al menos un título $\geq 1/200$ de MAT. En ambos casos con al menos neutrofilia $>70\%$ y leucocitosis $>8000/\text{mm}^3$ (16).

“No casos”: población con sospecha de leptospirosis derivados al laboratorio del INER en los cuales NO se detectó seroconversión a la MAT para leptospirosis, con neutrofilia $<70\%$ y leucocitosis $<8000/\text{mm}^3$. *Muestras para evaluar la reactividad cruzada*: los “No casos” incluyeron muestras de casos con diagnóstico confirmado

de enfermedades infecciosas con similar presentación clínica que la leptospirosis como: dengue, FHA; hantavirus y hepatitis A.

• **Población accesible. Muestra. Selección y tamaño de la muestra. Análisis de sesgos**

Se trabajó con paneles de seroconversión previamente tipificados. El panel incluyó todas las muestras de casos de una población de pacientes con sospecha de leptospirosis derivados al INER desde 1997 a 2006, provenientes de diferentes provincias del país que reunieron los requisitos de casos confirmados y no casos descritos previamente. Las características clínicas y epidemiológicas de esa población se describen en un estudio publicado previamente (15).

De la diferencia entre la fecha de la toma de muestra y la del inicio de los síntomas se obtuvieron los tiempos de evolución de la enfermedad para cada muestra y según ellos se las agruparon en tres etapas: etapa 1 (menos de 10 días de evolución), etapa 2 (de 10 a 25 días de evolución) y etapa 3 (más de 25 días de evolución). Estos paneles son representativos del universo donde se pretenden extrapolar los resultados de este estudio, que son todos los pacientes con sospecha de leptospirosis a nivel nacional, por lo tanto no representa una fuente de sesgos relevante.

Las variables medidas fueron las densidades ópticas (DO) de los diferentes ensayos realizados y con ellas posteriormente se evaluó el desempeño del ELISA IgG ANLIS-UNL.

• **Análisis de los resultados**

La sensibilidad y especificidad clínica, y el valor de Corte de este ELISA IgG desa-

rollado por el grupo ANLIS/UNL, ya fueron evaluados en estudios previos y publicados (16). El punto de corte de las pruebas se calculó de acuerdo al método diagnóstico definiendo la probabilidad de la enfermedad a través de la comparación con el criterio de "Definición de casos", en poblaciones de individuos "sanos o no casos" y "enfermos o casos confirmados". Para determinar el punto de corte óptimo se calculó el área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristics Curve*) utilizando el programa Medcalc® (17). Los resultados en los ensayos con paneles de sueros fueron procesados en programas estadísticos (MedCalc®, Statistix) para determinar el valor de corte, sensibilidad, especificidad e intervalos de confianza 95 %, valores predictivos positivos y negativos e índices de Youden (18) del ELISA evaluado. Con los resultados de los puntos anteriores de elaboraron los valores de referencia para el Kit.

Resultados

Se estudió la sensibilidad y especificidad analítica, precisión intra e inter-ensayo y estabilidad y condiciones de conservación del Kit prototipo de ELISA IgG con antígeno extractivo desarrollado por el grupo ANLIS-UNL. Para ello se prepararon "pooles" o mezclas de sueros positivos (PP), negativos (PN) y débiles positivos (PDP) con muestras de pacientes del panel preexistente en el Laboratorio de Leptospirosis del Instituto de Enfermedades Respiratorias (INER) E. Coni. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

1. Sensibilidad analítica (o reactividad biológica)

Para determinar la sensibilidad se estudió el desempeño del Kit frente a PP y también frente a muestras individuales MAT positivas.

a) Con mezclas de sueros: se efectuaron diluciones seriadas al medio del PP hasta negativización del ELISA. Se encontró que el máximo título positivo fue (1/16). Como para la realización de la prueba, cada muestra de suero se diluye previamente 1/200 la sensibilidad analítica real de ELISA fue de 1:3.200.

b) Con muestras individuales: se procesaron 2 muestras con títulos a la MAT de 1:400 y 1:3200. Se hicieron diluciones seriadas al medio de éstas y resultaron positivas hasta una dilución de 1:6.400 la primera y >1:32.600 la segunda.

2. Reactividad cruzada (o especificidad analítica o metodológica)

Se midió la reactividad cruzada debida a potenciales fuentes de error o interferencias presentes en el suero, excluyendo la reactividad cruzada por infecciones producidas por otros agentes infecciosos que fueron medidos en la especificidad diagnóstica. Las interferencias evaluadas fueron: *hiperlipemia e hipergamaglobulinemia, hiperbilirrubinemia y hemólisis*. Para evaluarla se emplearon dos tipos de muestras:

Controles estándar de las interferencias: hiperlipemia (Triglicéridos: 2g/l), hiperbilirrubinemia (4mg/dl) y hemólisis (Hg. 8g/dl). Para poder simular la situación más problemática y el posible efecto de las interferencias, se procesaron cada uno de estos estándares sumados a los controles positivos (CP) y negativos (CN). Se aplicó a ellos la misma dilución que a los "pooles" y se procesaron en forma conjunta en el mismo pocillo.

Muestras reales con las interferencias: muestras MAT negativas y positivas con hiperlipemia (11,35g/L), hipergamaglobulinemia (policlonal y monoclonal en proteínograma por electroforesis), hiperbilirrubinemia (13,61mg/dl) y hemólisis (4g/dl).

Después de evaluar todos los estándares con los CP y CN y las muestras reales (positivas y negativas) con las interferencias estudiadas, ninguno modificó su resultado de ELISA original, por lo que no se detectó ninguna interferencia.

3. Precisión intra-ensayo del Kit prototipo ELISA (reproducibilidad)

Se procesaron los 3 "pooles" (PP, PN y PDP) con 20 repeticiones de cada uno en un mismo ensayo por un mismo operador.

La concordancia entre los resultados fue excelente o total obteniéndose un índice Kappa (K) de 1.

El coeficiente de variación fue del 6,3 % en el PP, de 9,2 % en el PDP y de un 14,3 % en el PN.

4. Precisión inter-ensayo del Kit prototipo ELISA (repetibilidad)

Se evaluó la precisión inter-ensayo tanto entre un mismo operador como entre diferentes operadores.

a) Precisión intra-operador: se procesaron los 3 "pooles" (PP, PN y PDP) por un mismo operador repetidos 20 veces en 4 ensayos realizados en diferentes momentos. Se obtuvo un $k=1$ y un coeficiente de variación promedio del 8,0 % en el PP, 11,7 % en el PDP y 18,9 % en el PN

b) Precisión inter-operador: se procesaron los mismos 3 pooles repetidos 20 veces en un mismo ensayo realizado por 2 operadores diferentes. El índice kappa entre operadores fue excelente con un valor de

0,95 (IC95 %: 0,85–1,00). El único caso discordante fue un negativo que resultó débil positivo para uno de los operadores. El coeficiente de variación entre los 2 operadores fue del 7,8 % en el PP, 12,5 % en el PDP y de un 18,4 % en el PN.

5. Estabilidad y condiciones de conservación del Kit prototipo ELISA y de sus componentes

Estabilidad del Kit prototipo cerrado y de sus componentes: Envejecimiento natural en las condiciones óptimas (heladera 4–10 °C) en ambiente sin exceso de humedad.

Para ello se evaluaron 9 tiras escogidas al azar (72 pocillos) del kit cerrado y conservado por 6 meses y luego a los 12 meses en heladera (entre 4°–10 °C), probando controles provistos por el Kit positivos (CP) y negativos (CN) por cuadruplicado en cada tira. Los valores de las lecturas obtenidos se compararon con los resultados del control de calidad realizado al lote en su producción 6 y 12 meses antes.

Los valores de las lecturas de los controles positivos y negativos en todas las tiras fueron comparables con los obtenidos al momento de su producción, lo cual indica que todos los componentes del Kit fueron estables en condiciones óptimas de conservación.

Pruebas adicionales de estabilidad:

Estabilidad prolongada de las placas sensibilizadas: se evaluaron los mismos CP y CN en placas sensibilizadas 5 años atrás.

Los resultados obtenidos fueron comparables a los registrados al momento de su producción, lo cual significa que éstas son estables hasta los al menos 5 años luego de su producción.

Estabilidad del conjugado y solución de lavado provisto luego de llevados a dilución de uso: en ensayos independientes se llevaron a dilución de uso el conjugado y la solución de lavado y luego: a) se usaron el mismo día de acuerdo con las especificaciones del Kit y además b) a las 24 hs, c) 48 hs y d) una semana después.

Aunque el poder discriminatorio entre los controles del Kit no se vio alterado a medida que fue pasando el tiempo desde que se diluyó el conjugado y la solución de lavado provista (mismo día hasta una semana después), la relación entre CP y CN descendió muy levemente a expensas principalmente de un ascenso de las lecturas de los CN aun hasta una semana luego de diluidos.

Envejecimiento acelerado a temperaturas extremas a las que pudiera ser sometido el equipo, como ser debidas al transporte o almacenamiento.

Se evaluó el funcionamiento del Kit luego de 24hs, 48hs y hasta 1 semana expuesto a 37 °C en estufa y 24 hs a -20 °C. Se procesaron por cuadruplicado los controles provistos por el Kit (CP y CN) en una tira (8 pocillos) para cada situación. Además para poder comparar se repitió este mismo ensayo con todos los componentes del Kit en condiciones óptimas de conservación. Como se tenían conocimientos previos de que el componente menos estable del Kit a temperaturas elevadas eran los sueros controles se incluyó además otro control que consistió en procesar por duplicado todos los componentes del Kit mantenidos en condiciones óptimas pero con los sueros controles sometidos a cada una de las situaciones extremas.

– En estufa a 37 °C. Luego de mantener el Kit a esta temperatura las lecturas de los CP bajaron un 50 % a las 24hs y un 70 %

tanto a las 48hs como a la semana, respecto a las lecturas de los mismos CP mantenidos en condiciones óptimas. Mientras que los resultados de los CN se mantuvieron constantes y comparables a los mismos conservados en condiciones óptimas. Ninguno de los otros componentes fue afectado luego de 24hs, 48hs y hasta 1 semana de expuestos a 37 °C, cuando se estudió cada componente expuesto a esta temperatura y el resto de los componentes mantenidos en condiciones óptimas. Por lo que se hicieron tantos ensayos como componentes tenía el Kit.

– En freezer a -20 °C. Como a las 24hs de mantener el Kit prototipo a esta temperatura, el Cromógeno (TMB-H₂O₂) ya había virado a celeste, no se realizó el ensayo como se indica en el inserto del Kit si esto sucede.

– El valor de corte, sensibilidad y especificidad se obtuvieron en un estudios previos publicados por etapas de la enfermedad y en forma global (16 y 19).

6. Valor de corte del Kit prototipo ELISA

El valor de corte o *cut off* hallado para el Kit prototipo ELISA cualquiera sea la etapa de la enfermedad fue de REL=2,3 (19).

7. Sensibilidad clínica o diagnóstica del Kit prototipo ELISA

La Sensibilidad hallada para la etapa 2 fue de 93,2 % (IC95 %:96,1 – 99,9) (16).

8. Especificidad clínica o diagnóstica/ especificidad relativa del Kit prototipo ELISA

La especificidad hallada para la misma etapa 2 fue de 99,3 % (IC95 %: 96,1 – 99,9) (16).-

No se observó reactividad cruzada del Kit frente a las muestras con diagnóstico confirmado de enfermedades infecciosas con similar presentación clínica que la leptospirosis.

9. Valores de referencia del Kit prototipo ELISA identificados

Interpretación de los resultados en base a ello lecturas con valores de relaciones (REL):

1. Muestra positiva: con un valor de REL superior a 2.3.

2. Muestra negativa: Toda muestra con un valor de REL inferior a 2,0

3. Muestra sospechosa: Toda muestra con un valor de REL igual o superior a 2.0 e igual o inferior a 2.3. Estas muestras deben ser ensayadas nuevamente y/o solicitar nueva muestra.

Discusión

La sensibilidad analítica hallada para el Kit Prototipo ELISA en este estudio fue muy elevada de 1:3.200 a >1:32.600 y por lo tanto muy superior al valor de corte teórico 1:50 de la MAT. En la evaluación de la reactividad cruzada o especificidad analítica o metodológica, no se detectaron interferencias debido a hiperlipemia e hipergamaglobulinemia, hiperbilirrubinemia y hemólisis. La posibilidad de acceder a un resultado confiable independientemente de la calidad de la muestra constituye una gran ventaja respecto de los métodos de aglutinación (como la MAT y el TR) los cuales solo son interpretables si las muestras no tienen ninguna de estas interferencias.

La concordancia tanto intra-ensayo (reproducibilidad) como inter-ensayos (repetibilidad entre un mismo operador u operadores diferentes) hallada fue total o

excelente. Esto implica que los resultados obtenidos por este Kit serían comparables entre diferentes laboratorios.

Ninguno de los componentes del equipo se deterioraron cuando se conservaron en heladera (4–10 °C), según sus especificaciones, hasta al menos un año luego de su producción. Las placas sensibilizadas fueron estables por al menos cinco años, lo cual implica que el vencimiento del Kit podría ser muy superior al año inicialmente estudiado, por lo que debería seguir siendo evaluado en el tiempo.

Aunque el conjugado y la solución de lavado fueron estables hasta la semana de llevados a la dilución final de trabajo, su funcionamiento fue óptimo hasta las 24hs. Esto resalta la importancia del cumplimiento de las especificaciones del Kit en cuanto a no conservar estos componentes una vez llevados a dilución de trabajo.

Los controles positivos fueron los únicos componentes críticos que se deterioran refrigerados y llegar a destino dentro de este período. Como el congelamiento inutiliza la solución cromógeno e inhabilita la utilización del Kit, debe prestarse especial cuidado a la temperatura de la heladera y nunca conservarse en el freezer o congelador.

La sensibilidad y especificidad diagnóstica del Kit Prototipo ELISA IgG fue bueno, sumados a la gran estabilidad, repetitividad y reproducibilidad de sus resultados, indicarían que constituye una nueva e importante herramienta para el tamiz diagnóstico de los casos de leptospirosis a ser aplicada en éste u otros países.

• Abreviaturas y acrónimos

RNLL: Red Nacional de Laboratorios de leptospirosis.

UNL: Universidad Nacional del Litoral.

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

MAT: microaglutinación.

ELISA: enzimoimmunoensayo.

TR: método de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente.

FBCB: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

PP: "pool" o mezcla de sueros positivos.

PN: "pool" o mezcla de sueros negativos.

PDP: "pool" o mezcla de sueros débiles positivos.

IC95: Índice de Confianza de 95 %.

CP: controles positivos.

CN: controles negativos.

DO: densidad óptica.

REL: relación entre la DO de la muestra dividida por la DO promedio de los controles negativos.

Agradecimientos

A la Facultad de Bioquímica y Ciencia Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (UNL).

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Dr. E. Coni (ANLIS) Malbrán.

Referencias bibliográficas

1. World Health Organization, 1999. Leptospirosis worldwide. *Weekly Epidemiological Record*. **74**: 237–244.
2. Bharti, A.R.; Nally, J.E.; Ricaldi, J.N.; Matthias, M.A.; Díaz, M.M.; Lovett, M.A.; Levett, P.N.; Gilman, R.H.; Willig, M.R.; Gotuzzo, E.; Vinetz, J.M., 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* **3**(12): 757–771.
3. Farr, R.W., 1995. Leptospirosis. *Clin. Inf. Dis.* **21**, 1–6: quiz 7–8.

4. Gouveia, E.L.; Metcalfe, J.; Carvalho, L.A.; Aires, T.S.F.; Villasboas-Bisneto, J.; Queiroz, A.; Santos, A.; Salgado, K.; Reis, M.G. and Ko, A., 2008. Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil, *Emerging Infectious Diseases* **14** (3).
5. Perani, V.; Farina, C.; Maggi, L.; Michetti, G.; Moiola, F.; Pizzocaro, P. and Pugliese, C., 1998. Pneumonia due to *Leptospira* spp.: results of an epidemiological and clinical study. *Int. J. Tuberc Lung Dis.* **2**: 766–770.
6. Vanasco, N.B.; Sequeira, G.; Dalla Fontana, M.L.; Fusco, S.; Sequeira, M.D.; Enría, D., 1998. Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril. *Rev Panam Salud Pública* 2000; **7**, 1: 35–40. ISSN 1020–4989, Washington, DC, USA.
7. Vanasco, N.B.; Lottersberger, J.; Schmeling, Sequeira, M.; Tarabla, H., 2001. Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents. *Vet. Mic.* **82**, 4: 321–330.
8. Vanasco, N.B.; Fusco, S.; Zanuttini, J.C.; Dalla Fontana, L.; Manattini, S.; Prez, J.; Cerrano, D.; Sequeira, M.D., 1998. Brote de leptospirosis humana luego de una inundación. Reconquista (Santa Fe). *Rev Arg Microbiol* 2002; **34**: 124–131.
9. Vanasco, N.B.; Kemerer, R.; Oliva, M.E., 2004. Brote de leptospirosis rural en un tambo de la provincia de Entre Ríos, Argentina, febrero-marzo 2003. *Salud (i) Ciencia*; **12** (4) 26: 31. <http://www.ssiicsalud.com/dato/dat038/04601024.htm>
10. Kobayashi, Y., 2005. Human Leptospirosis: Management and Prognosis. *J. Postgrad. Med.*; **51**: 201–204.
11. Adler, B.; Chappel, R.J. & Faine, S., 1982. The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg* **252**: 405–413.
12. Faine, S.B.; Adler, B.; Bolin, C. & Perolat, P., 1999. *Leptospira and leptospirosis*. MediSci, Melbourne, Australia.
13. Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 296–326.
14. World Health Organization, International Leptospirosis Society (ILS), 2003. *Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control*.
15. Vanasco, N.B.; Schmeling M.F.; Lottersberger, J.; Costa, F.; Ko, A.; Tarabla, H.D., 1999–2005. Clinical Characteristics and Risk Factors of Human Leptospirosis in Argentina. *Acta Tropica* 2008 Jul.; **107**, 3: 255–258.
16. Vanasco, N.B.; Lottersberger, J.; Schmeling, F.; Gardner, I.; Tarabla, H., 2007. Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de un ELISA-IgG en diferentes etapas de la enfermedad en Argentina. *Pan Am J Public Health.* **21**, 6: 388–395.
17. Schoonjans, F.; Zalata, A.; Depuydt, C.E.; Comhaire F.H., 1995. Med-Calc: a new computerprogram for medical statistics. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* **48**, 3: 257–262.
18. Tarabla, H.D., 2000. *Epidemiología Diagnóstica*. Ediciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina. 120 pp.
19. Vanasco, N.B.; Lottersberger, J.; Guerrero, S.A.; Chiani, Y.; Schmeling, M.F.; Tarabla, H.D., 2011. Evaluation of ELISA antigens for leptospiral serodiagnosis in different stages of the disease. VII Reunión de la Sociedad Internacional de Leptospirosis, Mérida, Yucatán, México, 19 al 22 de septiembre.