

# Evaluación de la prueba de rivanol para el diagnóstico de brucelosis en caprinos

Efrén Díaz Aparicio\*,\*\*  
Laura Hernández Andrade\*  
Virginia Ochoa Díaz\*\*  
José María Blasco Martínez\*\*\*  
Francisco Suárez Güemes\*\*

## Abstract

The goal of this study was to evaluate the rivanol test for the confirmation of the diagnosis of brucellosis in goats. Sensitivity and specificity were also determined. The test was performed with a commercial antigen of *Brucella abortus*. Dilutions used were 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 and 1:400. For the sensitivity determination, sera from 64 infected goats with a positive isolation of *B. melitensis* were used. Specificity was evaluated using 50 sera from brucellosis free goats. Specificity in vaccinated goats was determined using sera from 22, 3 to 4 month old goats vaccinated with Rev 1 ( $1 \times 10^9$  cfu/ml), and 59 adult goats vaccinated with a reduced dose of Rev 1 ( $1 \times 10^5$  cfu/ml). Sera were collected on days 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 after vaccination. In the infected group, 54 animals were positive. Titers varied from 1:25 to 1:400; and sensitivity was 83%. There were no positive reactors to the rivanol test in the *Brucella* free animals, resulting in 100% specificity. In the vaccinated group with the standard dose, all animals reacted from days 7 to 90; 27% of the animals reacted on days 120 and 150, and 9% of the animals from days 180 to 240 were positive. Sera from the goats vaccinated with the reduced dose reacted with a 100% on days 7 to 90; 35% on days 120 and 150, 21% on days 180, and 6% both on days 210 and 240. It is concluded that the rivanol test does not offer advantages to be used as a confirmatory test for brucellosis in goats.

**Key words:** GOATS, RIVANOL, BRUCELOSIS

## Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la prueba de rivanol para el diagnóstico de brucelosis caprina, determinando su sensibilidad y especificidad. La prueba se realizó con antígeno comercial de *Brucella abortus*, utilizando las diluciones 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400. Para determinar la sensibilidad se utilizaron 64 sueros de caprinos con infección demostrada por aislamiento de *B. melitensis*, la especificidad se evaluó con 50 sueros de caprinos procedentes de hatos y de zonas libres de brucelosis. La especificidad en cabras vacunadas se obtuvo usando sueros de 22 cabras jóvenes de 3 a 4 meses de edad vacunadas con dosis clásica ( $1 \times 10^9$  ufc/ml) de Rev 1 *B. melitensis* por vía subcutánea y 59 cabras adultas vacunadas con dosis reducida ( $1 \times 10^5$  ufc/ml) de Rev 1 por vía subcutánea, a partir de los cuales se colectaron muestras serológicas los días 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 posvacunación. Del grupo de animales infectados 54 sueros resultaron positivos con títulos que variaron de 1:25 a 1:400, resultando la sensibilidad de 83%. El grupo de caprinos procedentes de zonas libres de brucelosis no presentó ningún resultado positivo, por lo que la especificidad fue del 100%. El grupo de cabras jóvenes vacunadas con dosis clásica presentó de los 7 a los 90 días 100% de reactivos; a los 120 y 150 días, 27%; de los 180 a los 240 días, 9%. Los sueros de cabras vacunadas con dosis reducida reaccionaron 100% de los 7 a los 90 días; a los 120 y 150 días, 35%; a los 180 días, 21%; y a los 210 y 240 días, 6% de positivos. Se concluye que la prueba de rivanol no ofrece ninguna ventaja para ser utilizada en el diagnóstico de la brucelosis caprina como prueba confirmatoria.

**Palabras clave:** CAPRINOS, RIVANOL, BRUCELOSIS.

Recibido el 30 de mayo de 1999 y aceptado el 23 de noviembre de 1999.

\* Proyecto Brucelosis, CENID Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Apartado postal 41-682, México, D.F. 11001, México. Tel. (5) 57038 86. diaza@inifap2.inifap.conacyt.mx

\*\* Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

\*\*\* Unidad de Sanidad Animal, Servicio de Investigación Agroalimentaria, Diputación de General Aragón, Apartado 727, 50080, Zaragoza, España.

## Introducción

La prueba de rivanol fue desarrollada en 1964 por Anderson y constituye junto con la fijación del complemento (FC), las pruebas confirmatorias oficiales para el ganado bovino avaladas por la Norma Oficial Mexicana (NOM) de la Campaña Nacional contra la Brucelosis Animal.<sup>1</sup>

La prueba de rivanol se realiza a los sueros de animales positivos a la prueba de tarjeta, con la finalidad de diferenciar una respuesta posvacunal de una respuesta de tipo infeccioso.<sup>1</sup>

El rivanol es un colorante de acridina que tiene la capacidad de sedimentar las proteínas del suero, entre ellas los anticuerpos de tipo IgM que predominan en el caso de una vacunación o infección primaria, quedando los de tipo IgG, que se encuentran en mayor cantidad sólo en estimulaciones inmunogénicas posteriores. Para lograr una buena aglutinación se utiliza una solución de rivanol al 1% junto con el suero del animal a probar, en una proporción de 1:1; esta reacción provocará la sedimentación de IgMs y un sobrenadante rico en IgGs, se emplea un antígeno de *Brucella abortus* especialmente sensible para compensar el efecto de la dilución de los anticuerpos.<sup>2</sup>

Para la interpretación de los resultados de la prueba de rivanol en bovinos, se debe tomar en cuenta si hubo vacunación previa, además los animales no deben ser muestreados hasta 10 meses después de la vacunación.<sup>1</sup>

La prueba de rivanol es una útil herramienta diagnóstica para la brucelosis en los bovinos; sin embargo, su uso en caprinos no es recomendado por la NOM de la Campaña Nacional contra la Brucelosis Animal.<sup>1</sup> En estudios realizados por Mikolon *et al.*,<sup>3</sup> en 1998, se utilizaron 8 hembras y 2 machos caprinos, inoculados con  $10^8$  unidades formadoras de colonias (ufc) de *B. melitensis* biotipo 1, se encontró una sensibilidad del 40% al 70%, dependiendo de la dilución y de la semana de muestreo posinoculación. La especificidad que se notificó fue del 99% al 100%.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la utilización de la prueba de rivanol para el diagnóstico confirmatorio de brucelosis en caprinos, determinar su sensibilidad usando sueros de cabras naturalmente infectadas y con aislamiento de *B. melitensis* y la especificidad tanto en caprinos negativos como en vacunados, utilizando diferentes protocolos, con *B. melitensis* Rev 1.

## Material y métodos

### Pruebas diagnósticas

La prueba de rivanol se realizó con antígeno comercial de *B. abortus*\* preparado a una concentración celu-

lar de 4.5%, siguiendo la técnica descrita en la literatura,<sup>4</sup> utilizando las diluciones 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400. La prueba de tarjeta se realizó con antígeno de *B. abortus* preparado a una concentración celular del 3%<sup>5</sup> y la prueba de FC se llevó a cabo como se menciona en la literatura.<sup>4</sup>

### Muestras serológicas

Para determinar la sensibilidad se utilizaron 64 sueros de caprinos con infección demostrada por aislamiento de *B. melitensis*, la especificidad se evaluó con 50 sueros de cabras procedentes de hatos y de zonas libres de brucelosis, de las cuales no fue posible recuperar *B. melitensis* a partir de muestras de leche de los animales que se encontraron en lactancia. La especificidad en cabras vacunadas se obtuvo usando los sueros de 22 cabras jóvenes de 3 a 4 meses de edad, vacunadas con dosis clásica ( $1 \times 10^9$  ufc/ml) de la vacuna comercial Rev 1 *B. melitensis*\*\* por vía subcutánea y 59 cabras adultas vacunadas con dosis reducida ( $1 \times 10^5$  ufc/ml) de Rev 1 por vía subcutánea, a partir de los cuales se colectaron muestras serológicas los días 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 posvacunación. Todos los sueros se mantuvieron en congelación a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de realizar las pruebas.

### Análisis estadístico

Las ecuaciones para determinar la sensibilidad y la especificidad son las descritas por Thursfield.<sup>6</sup>

La concordancia entre la prueba de rivanol y las pruebas de tarjeta y FC para los resultados de los sueros positivos y negativos fue medida con el índice de Kappa.<sup>7</sup>

## Resultados

Del grupo de 64 caprinos con aislamiento de *B. melitensis*, 53 resultaron positivos a rivanol con títulos que variaron de 1:25 a 1:400 (Cuadro 1), por lo que la sensibilidad fue del 82.81% (Cuadro 2); la prueba de tarjeta dio 59 sueros positivos, por lo que su sensibilidad fue del 92.18%; la FC presentó 62 reactores con una sensibilidad del 96.87%. De los 64 sueros de caprinos con aislamiento de *B. melitensis*, fueron negativos a FC sólo 3.1% a diferencia del 15.6% de negativos a rivanol (Cuadro 3).

Los 59 sueros con aislamiento de *B. melitensis* que resultaron positivos a tarjeta, al ser evaluados en las pruebas confirmatorias, dieron los siguientes resultados: en rivanol 53 resultaron positivos y 6 negativos. En FC todos fueron positivos.

En el grupo de 50 sueros de caprinos procedentes de zonas libres de brucelosis, las pruebas de rivanol,

\* Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE)

\*\* Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE)

**Cuadro 1**  
RESULTADOS DE 64 SUEROS DE CAPRINOS CON AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis*, EVALUADOS EN LAS PRUEBAS DE RIVANOL Y TARJETA

<i>Prueba de rivanol</i>	<i>Prueba de tarjeta</i>		<i>Totales</i>
	<i>Negativos a tarjeta</i>	<i>Positivos a tarjeta</i>	
Negativos a rivanol	5	6	11 (17.2%)
1:25	0	12	12 (18.8%)
1:50	0	9	9 (14%)
1:100	0	4	4 (6.2%)
1:200	0	3	3 (4.8%)
1:400	0	25	25 (39%)
Totales	5 (7.8%)	59 (92.2%)	64 (100%)

**Cuadro 2**  
DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE RIVANOL, CON BASE EN LOS RESULTADOS DE 64 SUEROS DE CAPRINOS CON AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis* Y DE 50 SUEROS DE CAPRINOS PROCEDENTES DE HATOS Y ZONAS LIBRES DE BRUCELOSIS Y SIN AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis*

		<i>Aislamiento bacteriológico</i>		<i>Total</i>
		<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>	
RIVANOL	Positivos	53 (a)	0 (b)	53 (a + b)
	Negativos	11 (c)	50 (d)	61 (c + d)
	Totales	64 (a + c)	50 (b + d)	114 (a+b+c+d)

Sensibilidad =  $a / (a + c) = 53 / (64) = 82.81\%$

Especificidad =  $d / (b + d) = 50 / (50) = 100\%$

**Cuadro 3**  
RESULTADOS DE 64 SUEROS DE CAPRINOS CON AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis*, EVALUADOS EN LAS PRUEBAS DE RIVANOL Y FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO

Prueba de rivanol		Fijación del complemento (FC)						
Negativo a rivanol	Negativo a la FC	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Totales
	3	4	3	1	0	0	0	11 (17.2%)
1:25	0	0	2	6	3	0	0	11 (17.2%)
1:50	0	1	2	2	3	1	0	9 (14%)
1:100	0	0	1	1	1	1	0	4 (6.3%)
1:200	0	1	1	1	0	0	0	3 (4.7%)
1:400	0	0	0	1	9	10	6	26 (40.6%)
Totales	3 (4.7%)	6 (9.4%)	9 (14%)	12 (18.8%)	16 (25%)	12 (18.8%)	6 (9.3%)	64 (100%)

tarjeta y FC no presentaron ningún resultado positivo, por lo que la especificidad para todas las pruebas fue del 100% (Cuadro 2).

El grupo de cabras jóvenes vacunadas con la dosis clásica, presentó en la prueba de rivanol, con-

siderando positivos los sueros reactivos a cualquier dilución, los siguientes resultados: de 7 a 90 días posvacunación se presentaron 100% de reactivos; a los 120 y 150 días, 27% de positivos; de 180 a 240 días, 9% de positivos.

Cuadro 4

CONCORDANCIA ENTRE LAS PRUEBAS DE RIVANOL Y TARJETA UTILIZANDO SUEROS DE 64 CABRAS CON AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis* Y DE 50 SUEROS DE CAPRINOS PROCEDENTES DE HATOS Y ZONAS LIBRES DE BRUCELOSIS Y SIN AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis*

		Prueba de tarjeta		
		Positivos	Negativos	Total
RIVANOL	Positivos	53	0	53
	Negativos	6	55	61
	Totales	59	55	114

Ji-cuadrada de Mc Nemar (1) = 1.67  $P > 0.1$

Concordancia observada =  $53 + 55 / 114 = 0.947$

Concordancia esperada =  $59 (53) + 55 (61) / 114^2 = 0.4987$

$$\text{Kappa} = \frac{C. \text{ observada} - C. \text{ esperada}}{1 - C. \text{ esperada}} = \frac{0.947 - 0.4987}{1 - 0.4987} = 0.89$$

Cuadro 5

CONCORDANCIA ENTRE LAS PRUEBAS DE RIVANOL Y FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO UTILIZANDO SUEROS DE 64 CABRAS CON AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO DE *Brucella Melitensis* Y DE 50 SUEROS DE CAPRINOS PROCEDENTES DE HATOS Y ZONAS LIBRES DE BRUCELOSIS Y SIN AISLAMIENTO DE *Brucella Melitensis*

		Fijación del complemento		
		Positivos	Negativos	Total
RIVANOL	Positivos	53	0	53
	Negativos	11	50	61
	Totales	64	50	114

Ji-cuadrada de Mc Nemar (1) = 1.67  $P > 0.1$

Concordancia observada =  $53 + 50 / 114 = 0.903$

Concordancia esperada =  $64 (53) + 50 (61) / 114^2 = 0.495$

$$\text{Kappa} = \frac{C. \text{ observada} - C. \text{ esperada}}{1 - C. \text{ esperada}} = \frac{0.903 - 0.495}{1 - 0.495} = 0.80$$

En el grupo de cabras adultas vacunadas con dosis reducida el rivanol presentó a los diferentes días posvacunación los siguientes resultados: de 7 a 90 días, 100% de reactivos; de 120 y 150 días, 35% de positivos; a los 180 días, 21%; y a 210 y 240 días, 6% de positivos.

La concordancia obtenida entre el rivanol con la prueba de tarjeta fue de 0.89 (Cuadro 4) y la concordancia entre los resultados de rivanol con la FC fue de 0.80 (Cuadro 5).

## Discusión

El rivanol es una prueba diagnóstica confirmatoria utilizada en bovinos, en los que la sensibilidad y la especificidad son de 83% y 93%, respectivamente; sin embargo, en caso de una revacunación única o múltiple la prueba da gran cantidad de resultados falsos positivos.<sup>8-10</sup>

La NOM de la Campaña Nacional contra la Brucelosis Animal, indica que las pruebas serodiagnósticas recomendadas para caprinos son la prueba de tarjeta como tamiz y la FC como prueba confirmatoria,<sup>4</sup> no se utiliza la prueba de rivanol en caprinos, debido a que los estudios que se tienen al respecto son en un número limitado de animales<sup>3</sup> y no ha sido evaluada su eficacia en animales vacunados. En el caso de cabras vacunadas con Rev 1 a cualquier dosis, la NOM de la Campaña Nacional establece que no deben realizarse las pruebas serodiagnósticas de tarjeta y FC, hasta después de ocho meses posvacunación, esto es debido a que estas pruebas no son capaces de discernir entre anticuerpos debidos a la vacunación y de infección.<sup>4</sup>

Existe un vacío en el diagnóstico, ya que no existe en la NOM una prueba serológica que pueda diferenciar tempranamente entre caprinos vacunados e infectados, en bovinos el rivanol cumple esa función, ya que esta prueba es capaz de diferenciar bovinos vacunados de infectados a partir de los 150 días posvacunación con dosis clásica de cepa 19.<sup>9</sup>

Sin embargo, existen pruebas como son la inmunodifusión radial (IDR) con hapteno nativo que en diversos trabajos ha demostrado su utilidad para diferenciar entre animales vacunados recientemente de animales infectados en bovinos, caprinos y ovinos.<sup>5, 11-14</sup> Otra prueba que sirve para este fin es el ELISA competitivo que ha demostrado su eficacia en bovinos y caprinos.<sup>15, 16</sup>

El lipopolisacárido por su localización externa en la célula son los primeros antígenos contra los que aparecen inmunoglobulinas de tipo M y G, tanto en la infección como en la vacunación,<sup>17</sup> la respuesta humoral contra la brucelosis en cabras ha sido evaluada recientemente y se observó que los animales infectados con cepas de campo de *B. melitensis* o vacunadas con Rev 1 presentan en general una ligera respuesta de IgM que alcanza su máxima concentración entre los días 20 a 30 y una mayor respuesta de IgG con concentraciones máximas entre los 30 a 60 días después de la infección o de la vacunación, siendo el isotipo IgG2 el dominante.<sup>18</sup> En bovinos la respuesta de inmunoglobulinas tiene una cinética clásica en las primeras etapas de la infección, después de la primera semana aparecen anticuerpos de clase IgM, que alcanzan su nivel más alto a las cuatro semanas, progresivamente

empieza a elevarse el título de IgG. Los niveles de IgM pueden permanecer altos por mucho tiempo.<sup>19</sup>

La sensibilidad de la prueba de tarjeta con antígeno de *B. abortus* a una concentración celular del 3% fue del 92%, resultando un poco menor este valor que los notificados por otros autores;<sup>5, 20</sup> sin embargo, al presentar una elevada sensibilidad cumple una de las premisas para ser una buena prueba tamiz, donde los sueros negativos se dan como tales sin necesidad de pruebas confirmatorias.<sup>6</sup>

El hecho que de los 64 sueros con aislamiento, 59 resultasen positivos a tarjeta, y éstos al ser evaluados en las pruebas confirmatorias, diesen en rivanol sólo 53 positivos y que en la FC 62 sueros fueron positivos, indica que la prueba de rivanol no detectó al 14.51% de animales, lo cual no es aceptable para una prueba confirmatoria ya que en un programa de control o erradicación de la enfermedad estos animales negativos permanecerían en el rebaño impidiendo el avance del programa, lo que hace estos resultados cuestionables para su uso como prueba confirmatoria en caprinos. Los valores de sensibilidad del rivanol en sueros de caprinos con aislamiento de *B. melitensis* son menores que los encontrados para otras pruebas diagnósticas como FC, tarjeta, inmunodifusión radial con hapteno nativo, ELISA y contrainmunolectroforesis.<sup>5</sup>

Los anticuerpos encontrados por la prueba de rivanol persisten en 100% de las cabras vacunadas con Rev 1 a dosis clásica y reducida hasta los 3 meses posvacunación, disminuyendo hasta presentar un bajo porcentaje de reactores a los 6 meses; a los 8 meses que son los que marca la NOM para realizar el diagnóstico el porcentaje de positivos resultó entre 6 y 9; por lo tanto, el rivanol cumple con lo indicado por la NOM de que puede realizarse el diagnóstico 8 meses después de vacunados con Rev 1, pero la función de la prueba no se cumple ya que no es útil para diferenciar tempranamente caprinos vacunados, y en caso de dejar pasar los ocho meses posvacunación es mejor usar pruebas con mayor sensibilidad como tarjeta o FC, ya que como se demostró en este estudio estas pruebas mostraron 9.4% y 14.1% de positivos, que a la prueba de rivanol son falsos negativos.

La prueba de rivanol presenta una buena concordancia en los resultados de los sueros de cabras infectadas y negativas con tarjeta y FC; sin embargo, como se menciona anteriormente, esta similitud sólo podría aprovecharse al probar animales sin vacunar u ocho meses después de vacunados con Rev 1, lo que haría que se utilizara la prueba de tarjeta por ser más económica y sencilla que el rivanol.

No existen estudios previos sobre la sensibilidad y especificidad de la prueba de rivanol en caprinos vacunados con REV 1, sólo existen escasos trabajos

que evalúan otras pruebas serodiagnósticas en esta especie o en animales experimentalmente infectados.<sup>3,5,13,16,20-22</sup>

Estos resultados demuestran que el rivanol es una prueba confirmatoria que funcionaría como tal en los caprinos a los ocho meses posvacunación; sin embargo, al no cumplir la función primordial de esta prueba que es diferenciar sueros de caprinos recientemente vacunados, no funciona como prueba diferencial para caprinos por lo que se concluye que la prueba de rivanol no es adecuada para ser utilizada en el diagnóstico de la brucelosis caprina.

## Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Proyecto Conacyt 3348PB 9607 y por el PAPIIT-UNAM 504695.

## Referencias

1. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. Diario Oficial. México (DF), 20 de agosto 1996:43-66.
2. Aparicio BA. Prueba de rivanol. En: Díaz AE, Hernández L, Valero G, Velázquez F, editores. Diagnóstico de brucelosis animal. México (DF): Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 1998:45-48.
3. Mikolon AB, Gardner IA, Hietala SK, Hernandez de Anda J, Chamizo Pestaña E, et al. Evaluation of North American antibody detection test for diagnosis of brucellosis in goats. J Clin Microbiol 1998;36:1716-1722.
4. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, France: INRA, 1988.
5. Diaz-Aparicio E, Marin C, Alonso-Urmeneta B, Aragon V, Perez-Ortiz S, et al. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. J Clin Microbiol 1994;32:1159-1165.
6. Thursfield M. Epidemiología veterinaria. Zaragoza (España): Acribia, 1990.
7. Thompson DW, Walter DS. A reappraisal of the Kappa coefficient. J Clin Epidemiol 1988;41:949-958.
8. Nicoletti P. A preliminary report on the efficacy of adult cattle vaccination using strain 19 in selected dairy herds in Florida. Proceedings of the 80<sup>th</sup> Annual Meeting of the United States Animal Health Association; USA: 1976 United States Department of Agriculture, October 1976:134-138.
9. Reyes PR. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de varias pruebas diagnósticas usadas en brucelosis bovina (tesis de licenciatura). Cuautitlán (Edo. de México): Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. UNAM, 1996.
10. Aparicio BA. Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis revacunado con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus* (tesis de licenciatura). Cuautitlán (Edo. de México): Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. UNAM, 1997.

11. Jones L, Berman D, Moreno E, Deyoe D, Gilsford M, *et al.* Evaluation of a RID with poly-B for diagnosis of bovine brucellosis. *J Clin Microbiol* 1980;12:753-760.
12. Díaz R, Toyos MD, Salvo D, Pardo M. A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. *Ann Rech Vet* 1981;12:35-39.
13. Díaz AE, Alonso UB, Moreno E, Perez S, Blasco JM, *et al.* Comparative analysis of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 polysaccharides of A and M type for the serological diagnosis of cattle, sheep and goat brucellosis. *J Clin Microbiol* 1993;31:3136-3141.
14. Díaz AE, Moriyón UI, Blasco MJM, Marín AC, Díaz GR. Diagnóstico de *Brucella melitensis* en ovinos usando inmunodifusión radial con hapteno nativo. *Téc Pecu Méx* 1996;34:104-110.
15. Alfonseca SE, Díaz AE, Hernández AL, Velázquez QF, Suárez-Güemes F. Comportamiento de un inmunoensayo enzimático competitivo para el diagnóstico de brucelosis en cabras. *Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria. Vet Méx* 1995;26 (Supl 2):52.
16. Alfonseca SE, Díaz AE, Hernández AL, Suárez-Güemes F. Comportamiento de un inmunoensayo enzimático competitivo para el diagnóstico de brucelosis en diferentes grupos de bovinos. *Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria. Vet Méx* 1995;26(Supl 2):138.
17. Moriyón UI. *Brucella* cell structure. Proceedings of the 50<sup>th</sup> Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference; 1997 November 8-9; Chicago (IL). Chicago (IL): Brucellosis Research Conference, 1997:3-18.
18. Alfonseca SE. Determinación de isotipos en perfiles serológicos mediante un inmunoensayo enzimático indirecto en cabras vacunadas y desafiadas con *Brucella* spp (tesis de maestría). México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1998.
19. FAO/OMS: Comité mixto de expertos en brucelosis. Sexto informe. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud, 1986.
20. Blasco MJM, Garin-Bastuji B, Marín CM, Gerbier G, Fanlo J, Jimenez de Bagues MP, *et al.* Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Rec* 1994;134:415-420.
21. Falade S. A comparison of three serological tests in the diagnosis of caprine brucellosis. *Res Vet Sci* 1978;24:376-377.
22. Whagela S, Wandera JG, Wagner GG. Comparison of four serological tests in the diagnosis of caprine brucellosis. *Res Vet Sci* 1980;28:168-171.