REIVINDICACIONES MODIFICADAS CON RESPUESTA A SEGUND EXAMEN DE PATENTABILIDAD – P2019/000075

Habiendo descrito suficiente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:

1. KIT para prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque, caracterizado porque comprende: diez (10) microplacas antigenizadas con hapteno nativo crudo, de 96 pocillos cada una (distribuidos en 12 tiras de 8 pocillos cada tira) de fondo plano y claro, con superficie especialmente tratada para una alta capacidad de adhesión del antígeno, con capacidad máxima de 360 microlitros por pocillo; cinco (5) microplacas de 96 pocillos, sin tratamiento, para realizar la predilución de la muestra; cuatro (4) frascos de sesenta (60) mililitros cada uno con solución de lavado a base de PBS-Tween 20, al 0.05%, a concentración (10 X); un frasco (1) de cuarenta (40) mililitros de diluyente de la muestra, a base de CABI (Carbonato bicarbonato) a concentración (10 X); un (1) frasco de cincuenta (50) mililitros de diluyente de conjugado, a base de CABI (Carbonato bicarbonato) a concentración (1 X); un (1) frasco de 50 mililitros de Substrato, el cual es una solución acido 3-ethilbenzotiazolina-6-sulfónico; un (1) vial de un (1) mililitro que consta de 25 microlitros de conjugado concentrado, el cual es una inmuno globulina G – anti Bovina, conjugada con peroxidasa de rábano producida en cabra el cual está prediluido en un estabilizador de peroxidasas; un (1) frasco de cincuenta (50) mililitros de

solución de parada, la cual es Duodecilsulfato sódico (SDS) al 4%; un (1) vial de suero sanguíneo positivo liofilizado; un (1) vial de suero sanguíneo negativo liofilizado; un (1) vial de suero de leche positiva liofilizada; y un (1) vial de suero de leche negativa liofilizada; y en donde todos los viales de controles se presentan para su reconstitución en un (1) mililitro de agua destilada.

2. KIT para prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque los viales de suero sanguíneo y suero de leche positivos son controles positivos que presentan una absorbancia ≥ 1.0 y los viales de suero sanguíneo y suero de leche negativos son controles negativos que presentan una absorbancia de 0.20 – 0.28.

3. Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque caracterizado porque el hapteno nativo se emplea crudo, y es obtenido de una cepa de *B. melitensis 16M*, sin ningún tratamiento de purificación.

4. Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque de conformidad con la reivindicación 3 caracterizado además porque se realiza la sensibilización o antigenización de placas de ELISA con antígeno hapteno nativo crudo a

una concentración de 1 microgramo por pozo para diagnóstico de brucelosis en suero sanguíneo y leche.

5. Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque de conformidad con las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado además porque emplea controles de suero sanguíneo y leche liofilizados como método de conservación evitando su contaminación y la degradación de los anticuerpos presentes, y en donde los controles positivos presentan una absorbancia ≥ 1.0 y los controles negativos presenten una absorbancia de 0.20 – 0.28.

6. Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque caracterizado porque comprende las etapas de:

Distribuir 285 µL de un diluyente de muestra a cada pocillo en una microplaca de pre-dilución;

Agregar 15 µL de un control negativo en los pocillos A1 y B1; y 15 µL de un control positivo en los pocillos C1 y D1;

Agregar 15 µL de una muestra de suero sanguíneo o leche en los pocillos restantes;

Tomar 50 µL de las muestras y controles diluidos en la microplaca de pre-dilución;

Pasar las muestras y controles diluidos a una microplaca antigenizada con hapteno nativo, en donde el hapteno nativo se encuentra crudo sin ningún tratamiento de purificación;

Incubar la microplaca antigenizada durante 1 hora a 37°C;

Lavar cada pocillo con una solución de lavado previamente diluida y eliminar el exceso de solución;

Agregar un conjugado previamente diluido a dilución de 1:2000 a cada pocillo;

Incubar la Microplaca durante 1 hora a 37°C.

Lavar cada pocillo con una solución de lavado previamente diluida y eliminar el exceso de solución;

Agregar 50 µL de un substrato a cada pocillo;

Incubar la Microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente (21°C ± 5°C) en obscuridad;

Distribuir 50 µL de solución de parada y leer a una densidad óptica de 405 nm.

7. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque los controles positivos y los controles negativos corresponden a muestras de suero sanguíneo y de leche provenientes de animales y en donde los controles positivos presentan una absorbancia ≥ 1.0 y los controles negativos presenten una absorbancia de 0.20 – 0.28.

8. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque las etapas de lavar

cada pocillo con una solución previamente diluida comprende realizar 4 lavados, evitando que se sequen los pocillos entre cada lavado.

9. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la etapa de agregar un sustrato a cada pocillo se realiza sin exponer el substrato a la luz.

10. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el sustrato es una solución acido 3-ethilbenzotiazolina-6-sulfónico.

11. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la solución de parada es una solución de Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 4%.

12. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la lectura a una

densidad óptica de 405 nm es estable durante 30 minutos desde que se distribuye la solución de parada.