

REIVINDICACIONES MODIFICADAS CON RESPUESTA A TERCER EXAMEN DE PATENTABILIDAD

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 de un 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%, diluida en una proporción 1:10; 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 sustrato, el cual es una solución de ácido 2,2' – azino - bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); un (1) vial de un (1) mililitro que consta de 25 microlitros de conjugado concentrado, el cual es una inmunoglobulina 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 dodecilsulfato 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 de un 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 , a una longitud de onda de 405 nm, y los viales de suero sanguíneo y suero de leche negativos son controles negativos que presentan una absorbancia de 0.20 – 0.28, a una longitud de onda de 405 nm.

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

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

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

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

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

Pasar las muestras y controles diluidos a una microplaca antigenizada con hapteno nativo;

Incubar la microplaca antigenizada;

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

Agregar un conjugado previamente diluido a cada pocillo;

Incubar la microplaca;

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

Agregar un sustrato a cada pocillo;

Incubar la microplaca;

Distribuir una solución de parada en cada pocillo y leer una densidad óptica; y

en donde el hapteno nativo se emplea crudo, y es obtenido de una cepa de *Brucella 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 de un animal y de tanque de conformidad con la reivindicación 3, en donde:

la etapa de distribuir un diluyente de muestra comprende distribuir 285 µL del diluyente de muestra a cada pocillo en la microplaca de pre-dilución;

la etapa de agregar un control negativo en los pocillos A1 y B1; y un control positivo en los pocillos C1 y D1, comprende agregar 15 μ L del control negativo en los pocillos A1 y B1; y 15 μ L del control positivo en los pocillos C1 y D1;

la etapa de agregar una muestra de suero sanguíneo o leche en los pocillos restantes comprende agregar 15 μ L de la muestra de suero sanguíneo o leche en los pocillos restantes;

la etapa de tomar las muestras y controles diluidos en la microplaca de pre-dilución, comprende tomar 50 μ L de las muestras y controles diluidos en la microplaca de pre-dilución;

la etapa de incubar la microplaca antigenizada se realiza durante 1 hora a 37°C;

la etapa de agregar un conjugado previamente diluido a cada pocillo se realiza a dilución de 1:2000;

la etapa de incubar la microplaca se realiza durante 1 hora a 37°C.

la etapa de agregar un sustrato a cada pocillo comprende agregar 50 μ L del sustrato a cada pocillo;

la etapa de incubar la microplaca se realiza durante 15 minutos a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) en obscuridad;

la etapa de distribuir una solución de parada en cada pocillo comprende distribuir 50 μ L de solución de parada en cada pocillo, y

leer una densidad óptica se realiza a 405 nm.

5. Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque de conformidad con las reivindicaciones 3 y 4, 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.

6. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque de conformidad con las reivindicaciones 3 y 4, 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.

7. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque de conformidad con las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado porque la etapa de agregar un sustrato a cada pocillo se realiza sin exponer el sustrato a la luz.

8. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque de conformidad con las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado porque el sustrato es una solución ácido 2,2' – azino - bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

9. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque de conformidad con la reivindicaciones 3 y 4, caracterizado porque la solución de parada es una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 4%.

10. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque de conformidad con las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado porque la lectura de una densidad óptica a 405 nm es estable durante 30 minutos desde que se distribuye la solución de parada.

11. Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque de conformidad con las reivindicaciones 3 a 10, 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.

12. Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque de conformidad con las reivindicaciones 3 a 11, en donde los controles positivos presentan una absorbancia ≥ 1.0 , a una longitud de onda de 405 nm, y los

controles negativos presenten una absorbancia de 0.20 – 0.28, a una longitud de onda de 405 nm.

13. Un procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque de conformidad con la reivindicación 1 a 12, caracterizado porque los controles positivos y los controles negativos corresponden a muestras de suero sanguíneo y de leche provenientes de animales.