

KIT para prueba de ELISA indirecto a base de Hapteno nativo Crudo y controles liofilizados para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque.

DESCRIPCIÓN

OBJETO DE LA INVENCION

El ensayo inmunoenzimático indirecto de ELISA anti-HN, es una prueba que se fundamenta en la determinación de anticuerpos de isotipo IgG contra el antígeno denominado Hapteno Nativo (HN) de *Brucella* en muestras de suero sanguíneo, leche entera y/o suero de leche, ya sea individual o proveniente de tanque con capacidad de distinguir animales infectados, de aquellos animales con exposición temporal a la bacteria *Brucella spp.* Este producto es exclusivo para uso veterinario de diagnóstico *in vitro* en bovinos.

Lo novedoso de esta invención es el desarrollo de un kit de diagnóstico basado en la detección de anticuerpos contra el antígeno Hapteno nativo de la *Brucella*, utilizando el método de ELISA Indirecto. Este kit incluye microplacas antigenizadas con el antígeno Hapteno nativo en su forma cruda, las soluciones de lavado, diluyente muestra y conjugado, el conjugado concentrado, sustrato, solución de parada y sus controles positivo y negativo sometidos previamente a un proceso de liofilización, los cuales son específicos para suero sanguíneo y leche de bovino.

ANTECEDENTES

La presente invención se relaciona con el área biotecnológica, específicamente para la detección de brucelosis en ganado bovino a través de la detección de anticuerpos reaccionantes contra el antígeno Hapteno Nativo (HN) de *Brucella*. En la actualidad la brucelosis es una enfermedad infecciosa que afecta al ganado y al hombre, es ocasionada por cocobacilos Gram negativos del género *Brucella*. Es catalogada como una enfermedad bacteriana importante y de alto impacto en salud pública, ya que cada año son reportados cerca de 500,000 nuevos casos a nivel mundial;

además disminuye la producción de leche, retrasa el crecimiento de las crías, provoca abortos y produce problemas reproductivos en hembras lo cual se refleja en su producción.

En México, es considerada la zoonosis de origen bacteriano más importante, siendo *Brucella abortus* la especie que afecta primordialmente al ganado bovino. El control de la enfermedad depende de la aplicación de la NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. La estrategia fundamental de la campaña se basa en el diagnóstico y la vacunación.

La inmunización del ganado bovino en México se realiza con las cepas S19 y RB51 de *Brucella abortus*, al inducir la S19 la presencia de anticuerpos en el suero y en la leche que interfieren con las pruebas marcadas como oficiales, se ha utilizado como alternativa la cepa RB51 ^{4,5,6,7,8,9}. En cuanto a métodos de diagnóstico serológico, los más utilizados son Tarjeta y Rivanol en el caso de suero sanguíneo y para muestras de leche se emplea la Prueba de Anillo en Leche, consideradas en la NOM-041-ZOO-1995 como oficiales ^{2,10}. En estas pruebas se detectan anticuerpos contra los 5 componentes de la membrana externa de *Brucella*, principalmente dirigidos contra la cadena O del Lipopolisacárido (LPS) que es la estructura más antigénica de las cepas lisas, por lo tanto, es el primer antígeno contra el cual aparecen anticuerpos, sin embargo, estos anticuerpos se hacen presentes tanto en la infección como en la vacunación, así mismo, dada la reactividad cruzada existente entre el LPS de *Brucella* y el de otras bacterias Gram-negativas, el contacto con animales brucelosos, estrés productivo e incluso los factores medio ambientales es frecuente la aparición de falsos positivos ^{11, 12,13,14,15}.

En el manual de la Organización Internacional de Epizootias (OIE) sobre Brucelosis Bovina en animales terrestres, se resalta a las pruebas de interferón gamma, la prueba de precipitación que utiliza el hapteno nativo y el ELISA indirecto que se utiliza como antígeno el lipopolisacárido rugoso como prometedoras para diferenciar entre la brucelosis y la exposición a los microorganismos con reacción cruzada; también resalta la prueba de ELISA indirecto o la del anillo en leche, realizadas con muestras de leche completa, como eficaces para analizar y controlar la brucelosis en las vacas lecheras. Sin embargo, ninguna prueba serológica se considera adecuada para todas y cada una de las situaciones epidemiológicas. Por tanto, las muestras que son positivas en las pruebas de

análisis deben confirmarse utilizando una estrategia confirmativa establecida¹⁶. Por este motivo, se han desarrollado pruebas alternativas con antígenos diferentes al LPS para disminuir esta reactividad y otorgar mayores niveles de especificidad.

El análisis electroforético del LPS permite la identificación de un segundo componente, el Hapteno Nativo (HN), llamado segundo polisacárido o poly-B, pero por representar con toda certeza el equivalente en el género *Brucella* de los haptenos nativos de otras bacterias Gram negativas, actualmente se le denomina como HN ¹⁷. Es químicamente idéntico a la cadena O, en *B. melitensis*, la cadena O consiste en unidades repetidas de cinco residuos de *N*-formylperosamina, cuatro ligados a α -1,2 y uno ligado a α -1,3 ¹⁸. Es un antígeno intracelular, localizado en el espacio periplásmico, de naturaleza no proteica y de bajo peso molecular; características que lo hacen poco antigénico y la aparición de anticuerpos precipitantes en el suero de los animales depende de la intensidad de su estímulo antigénico. Es decir, solo se producirán anticuerpos anti-HN cuando el sistema inmune este expuesto prolongadamente al antígeno como es el caso de una infección y no por la vacunación ^{4,14,19,20,21,22}.

Hapteno nativo ha sido objeto de estudio a lo largo de años, en los cuales se ha descrito su eficiencia en diversos estudios aplicados en distintas especies y con distintos métodos. En 1981, se llevó a cabo una prueba de Inmunodifusión Radial (IDR) en suero sanguíneo de bovinos, describiendo la obtención del antígeno Hapteno Nativo a partir de una cepa de *B. melitensis* 16 M cultivada en Caldo Soya Trypticaseína por 48 h a 37 °C e inactivada con fenol 0.5%, además se realizan lavados con solución salina y resuspendida en agua destilada. En este método la extracción fue realizada con 3 y 2 volúmenes de etanol en donde el antígeno obtenido es purificado y probado por el método mencionado anteriormente en suero sanguíneo de bovinos ²³.

Para el diagnóstico de brucelosis en humanos, en 1986 se desarrolló un ELISA indirecto con HN. El HN extraído de *B. melitensis* 16 M por precipitación con etanol, el antígeno purificado y liofilizado fue adherido a las placas de ELISA (por 12 h a 37 °C) a una concentración de 2 µg por pozo, se colocaron cantidades conocidas de suero sanguíneo (100 µl), como conjugado se empleó IgG, IgA, IgM anti-human (goat) y NaOH 1N como solución de parada. Los resultados mostrados describen

un 99% de efectividad en la detección de IgG anti-HN en pacientes positivos a la enfermedad ²⁴. Se encuentran reportes de estudios realizados en España (1988) sobre el uso del hapteno en ELISA competitivo para brucelosis bovina en donde la extracción del antígeno es realizada al igual que en las referencias anteriores, a partir de *B. melitensis* 16 M en agar Soya Trypticaseína (TSA) para después ser realizar dos precipitados con etanol para la obtención del antígeno crudo que después es purificado por un largo proceso para su posterior liofilización. Después de realizar el recubrimiento de las placas de ELISA con el antígeno (over night 37 °C) se añaden 50 µl en cada pozo de suero sanguíneo y suero de leche, más 50 µ de una molécula heterologa dando un total de 100 µl de muestra por pozo para la formación del complejo Ag-Ac por competitividad, que reaccionan con el anticuerpo secundario (IgG anti-rabbit [goat]) y un sustrato, la lectura realizada a 450 nm de los resultados obtenidos permite evaluar la eficacia del antígeno ²⁵.

Con la prueba de IDR, en 1993 se empleó el antígeno HN extraído como se describió anteriormente por *Díaz R, et al.* (1981) y purificado por un largo proceso de diálisis y digestión se comprobó que era posible diferenciar bovinos y ovinos infectados de vacunados con una sensibilidad y especificidad muy similar a la fijación del complemento²⁶. En 1994 se demostró nuevamente la eficacia de HN en suero sanguíneo de cabras, a través de un ELISA indirecto en donde se emplearon distintas cepas de *Brucella* como *B. melitensis* 16 M, 115, Rev 1; *Brucella abortus* 2308. Estas cepas se cultivaron en caldo con agitación y para su cosecha fueron empleadas técnicas de lavado con solución salina y se resuspendió en agua destilada. La extracción del antígeno inactivado con fenol y esterilizado, se realizó con 3 y 2 volúmenes de etanol. Se purifico por digestión con nucleasas y proteinasa K, se extrajo con fenol y precipito con etanol, el extracto crudo se utilizó para antigenizar las placas de ELISA a una concentración de 0.25 µg por pozo, incubando over night a 4 °C. Los sueros sanguíneos de cabra se probaron por el método mencionado colocando 100 µl (suero diluido) por pozo, en donde se empleó IgG anti-cabra policlonal (conejo) y Proteína G recombinante como opciones de antígeno secundario. La lectura a 405 nm de las muestras demostró que ELISA HN en cabras presenta un 60% de especificidad ²⁷.

También se reporta un estudio en el año de 1996 en el cual se probó la sensibilidad de la prueba de IDR para la detección de anticuerpos anti-HN en suero sanguíneo de ovinos, comparando el HN extraído de distintas especies de *Brucella* y *Yersinia* (*Brucella melitensis* M16, Rev 1; *Brucella abortus* 2308; *Yersinia enterocolítica* O:9) cultivadas en caldo TSB, en el cual se concluyó que la sensibilidad de la prueba es mayor al emplear el HN (purificado y liofilizado) de *B. 30 melitensis* 16M²⁸. En un estudio comparativo entre los polisacáridos de *Brucella* en mediante un ELISA indirecto en ovinos y bovinos empleando cepas de *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16 M cultivadas en fermentador, se concluyó que por razones no especificadas, el Hapteno nativo no es el antígeno óptimo para el diagnóstico de brucelosis por este tipo de ensayos²⁹. En el año de 1999, en España se llevó a cabo un estudio comparativo entre una ELISA competitiva, una ELISA indirecta y la prueba de Rosa de Bengala (RB) en donde las tres empleaban LPS, contra la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) usando el HN extraído de una cepa de *B. melitensis* 16M tomando como base el método de extracción descrito en los antecedentes por Díaz R, et al. (1981), en donde con base a los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que con la prueba RB como prueba de screening y con IDGA como prueba confirmatoria se obtenía un sistema efectivo para diagnosticar brucelosis en ovinos, este esquema fue utilizado para la erradicación de brucelosis en bovinos en el mismo país³⁰. En el 2005, un grupo de investigadores realizó un estudio de ELISA indirecto con HN en bovinos, donde se obtuvieron resultados favorables empleando el HN extraído de *B. melitensis* 16M a una concentración de 2.5 µg/ml de antígeno por pozo, tomando como referencia los métodos descritos por Díaz R, et al. (1981) y Urmeneta B, et al (1998)³¹. Así mismo, en estudios más recientes, se reporta en la patente WO2008051065 A1, 2 de Mayo de 2008, una prueba de Fluorescencia Polarizada en la que se emplea el HN de *B. melitensis* Rev 1, cepa que ha sido empleada anteriormente, la cual fue cultivada en agar *Brucella* e inactivada con fenol, en donde el HN fue extraído con etanol, dializado y purificado para la detección de anticuerpos anti-HN en caprinos³².

Con la finalidad de hacer más eficiente el diagnóstico confirmatorio de la brucelosis y de evitar los “falsos positivos” emitidos por las pruebas existentes basadas en la detección de anticuerpos anti-

lipopolisacáridos (anti-LPS) y otros inconvenientes como reacciones cruzadas con enterobacterias, y reacciones posvacunales, se pensó en el desarrollo de la presente prueba, que se pretende proteger por medio de la presente solicitud, pues se trata de una prueba de ELISA indirecta que es más eficiente en su aplicación y un kit adecuado para cumplir detectar la presencia de anticuerpos anti-Hapteno nativo, los cuales se producen únicamente en una franca infección de brucelosis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Es una invención novedosa para el diagnóstico de brucelosis, debido a que la expresión de anticuerpos contra Hapteno Nativo solo ocurre durante una infección de campo, permitiendo discriminar entre animales verdaderamente positivos de los falsos positivos, asegurando que los animales que son enviados al rastro corresponden únicamente a los animales infectados. Evita la presencia de animales falsos negativos dentro de la población sana, previniendo la propagación de la enfermedad. Además de utilizarse en suero sanguíneo, esta prueba también puede emplearse para el análisis en leche, característica novedosa ya que no existen reportes sobre pruebas diagnósticas que empleen el HN en leche. Esta prueba se puede emplear en leche por vaca individual o por tanque, con una capacidad de detección de 969.162 litros de leche positiva en un tanque de 30,000 litros, demostrando ser una prueba altamente sensible y específica. Por todo lo mencionado anteriormente, esta prueba puede tomarse como una herramienta que contribuya a la erradicación de la enfermedad evitando así el contagio a humanos.

1.- Producción del Antígeno

Siembra de *Brucella melitensis* 16M

La producción del antígeno se realiza en un área aislada, utilizando medidas de bioseguridad propias de un laboratorio de Microbiología (nivel 2 de bioseguridad). Los equipos utilizados en el área constan de una incubadora de CO₂, centrifuga, autoclave, refrigerador, mecheros Fischer y balanza analítica. La primera siembra se realiza a partir de la cepa *Brucella melitensis* 16M conservada en nitrógeno líquido utilizando la técnica de estriado en una placa de Petri con medio

agar soya tripticaseína (TSA). La placa de Petri se incuba a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% de 72 a 120 horas. Al crecer las colonias en la placa deberán checarse a contra luz, las colonias deben observarse de color azulado, característico de la cepa de *B. melitensis*. A partir de estas colonias, se realiza una resiembra en 10 placas nuevas con medio TSA para iniciar un nuevo lote de producción. Posteriormente se incuban bajo las condiciones de incubación mencionadas anteriormente. De esas diez placas se seleccionan las que no presenten contaminación para resembrar en aproximadamente 80 placas nuevas y se incuban bajo las mismas condiciones.

Cosecha

Después del tiempo de incubación se realiza la cosecha de las 80 cajas utilizando un cell scraper o una pipeta Pasteur doblada en forma de L y colocando las células en un tubo Falcon con 10 ml de solución salina estéril, el volumen de solución salina puede variar de acuerdo a la cantidad de células cosechadas. Se realiza un lavado; centrifugando a 6000 rpm por 30 minutos. Se desecha el sobrenadante obtenido y se resuspende el precipitado o pastilla, agregando el mismo volumen de solución salina que se agregó anteriormente. Se continúa con los lavados hasta que el sobrenadante obtenido quede transparente. Al finalizar los lavados se inactiva la cepa en la autoclave esterilizando a 120°C y 15 lb por 25 minutos.

Extracción

Esperar a que se enfríe y realizar una centrifugación a 6000 rpm por 30 minutos. Se toma el sobrenadante con una jeringa para tener un control del volumen obtenido. Este debe ser tomado del lado contrario a la pastilla para evitar contaminación. Se vierte en un vaso de precipitados de 100-500 ml, dependiendo del volumen obtenido. Al sobrenadante se le agregan tres volúmenes de etanol frío (ejemplo: si en el vaso hay 10 ml de sobrenadante se agregan 3 volúmenes de 10 ml de etanol). Se coloca en agitación magnética manteniéndolo a 4°C durante 18 horas para precipitar los antígenos. Después se centrifuga a 6000 rpm durante 30 minutos. Después se centrifuga a 6000 rpm durante 30 minutos, se toma la pastilla y se resuspende en solución salina, agregando

0.5 ml, mezclar y observar la turbidez, si se observa muy saturada se puede agregar 0.5 ml más, evitando llegar a la transparencia pues esto podrá diluir el antígeno de manera que se obtendrá una baja concentración de este, se identifica como antígeno LPS. Al sobrenadante se le agregan dos volúmenes más de etanol frío, manteniéndose en congelación (-20°C) por 18 horas sin agitación para precipitar el antígeno HN. Al terminar se centrifuga a 6000 rpm por 30 minutos. Se toma la pastilla formada y se resuspende en 0.5 ml de solución salina, observar la turbidez, se agrega más solución salina de ser necesario. Esta suspensión contiene el antígeno HN.

Liofilización del antígeno Hapteno Nativo Crudo

La liofilización del antígeno y controles se realiza en un área exclusiva para este procedimiento. El área en general cuenta con una presión negativa evitando la posible contaminación a las áreas adyacentes. El equipo consta de un liofilizador y un congelador.

Posterior a la extracción del antígeno, se hacen alícuotas de la suspensión de HN en viales de vidrio del mismo tamaño, colocando 1 ml en cada vial previamente rotulado. Los viales se congelan a -80°C de 30 min a 1 hora, colocando los tapones de los viales a medio cerrar para facilitar la extracción del vacío. Después de congelar los viales se colocan en las charolas del liofilizador equilibrando la cantidad de viales en cada lado. Se monitorea la presión y temperatura del liofilizador durante el proceso, la temperatura debe ser de aproximadamente -80°C . El proceso de liofilización deberá llevarse a cabo por lo menos durante 6 horas. Al finalizar la liofilización se deben tapar y sellar los viales. Para abrir los viales se pincha suavemente el tapón hasta observar que el antígeno deja de liberar presión para evitar que al abrirlo completamente se pierda antígeno debido a la liberación del vacío. Se pesan 2 mg del antígeno y se pasan a microtubos debidamente identificados. Los viales con antígeno pueden almacenarse en refrigeración a 4°C hasta su uso. Los procesos para la producción del antígeno se muestran en la **Figura 1**.

2.- Antigenización de microplacas

La antigenización de las placas se realiza en un área aislada dentro de una campana de bioseguridad tipo II, incubadora y refrigerador. El área en general debe contar con una presión ligeramente positiva.

Las microplacas antigenizadas contenidas en el kit son diez (10) microplacas de 96 pozos, distribuidas en 12 tiras de 8 pocillos cada una, de poliestireno con superficie especialmente tratada (por el fabricante) para una alta capacidad de adhesión del antígeno, con capacidad máxima de 360 microlitros por pocillo, fondo plano y claro. El procedimiento de antigenización es el siguiente: Se toma un microtubo con 2 mg del antígeno Hapteno Nativo liofilizado y se reconstituye con 1 ml de agua destilada estéril, asegurándose de disolver todo el contenido liofilizado. Una vez disuelto, el mililitro se agrega en 99 ml de solución buffer carbonato bicarbonato (CABI) para obtener un total de 100 ml (20µg/ml), y se mezcla perfectamente. A cada pocillo de las microplacas se le agrega 50 µl (**1µg de antígeno**) de esta solución y se recubren con parafilm. Las microplacas se incuban a 4°C durante 18 horas (Overnight).

Se realiza el lavado de las microplacas con una solución PBS-Tween 20 al 0.05% agregando 250 µl de esta solución a cada pocillo y desechándolo inmediatamente. Los lavados se realizan 4 veces. Se elimina el exceso de la solución de lavado sacudiendo la placa dos veces golpeándola suavemente en una superficie plana recubierta con una sanita. Posteriormente se agregan 50 µl de la solución de bloqueo (leche descremada al 3%) a cada pocillo y se cubren las microplacas. Se incuban a 37°C por 1 hora y al finalizar se realiza otra serie de cuatro lavados como se menciona anteriormente. Se elimina el exceso de solución de las microplacas y se cubren con la cubierta plástica adhesiva para microplacas. Se sellan en una bolsa plástica quitando el vacío, colocando 10 placas en cada bolsa etiquetada con nombre del producto, el número de lote, la fecha de elaboración y de caducidad. Las microplacas se almacenan en refrigeración de 2-8°C. El proceso mencionado anteriormente se describe en la **Figura 2**.

3.- Procedimiento de la ELISA indirecta anti-HN

Preparación de las Muestras

Antes de ser analizadas las muestras deberán de ser diluidas a una concentración de 1:20 con la solución Diluyente de Muestra (buffer CABI), utilizando una Microplaca de pre-dilución.

Suero sanguíneo: Las muestras de sangre se dejan coagular, y se centrifugan a 2500 rpm por 10 minutos. En muestras tomadas de 12-24 horas previas al ensayo no es necesario centrifugar. Las muestras con restos de fibrina deben centrifugarse antes de la prueba. No deben procesarse muestras altamente hemolizadas o lipémicas. Las muestras son estables durante 2 días almacenadas de 2-8°C ó 3 meses a - 20°C.

Leche: Las muestras de leche pueden procesarse como leche entera, agitando bien la muestra antes de cargar en la placa de pre-dilución, o bien puede cargarse como suero de leche. Para obtener suero de leche, las muestras se centrifugan a 2500 rpm durante 15 minutos y se elimina la capa superior que contiene grasa, utilizando un aplicador. La muestra es estable 3 días a 2-8°C o 3 meses a - 20°C.

Preparación de los Reactivos de la ELISA

La preparación de soluciones de lavado y diluyente se realizan en un área aislada dentro de una campana de flujo laminar. El pesaje de los reactivos se realiza utilizando una balanza analítica y el ajuste de pH se realiza con un potenciómetro. El área en general debe contar con una presión ligeramente negativa.

Diluyente de Muestras. Buffer carbonato bicarbonato (CABI): Diluir la solución Diluyente de Muestra 10X en una proporción 1:10 en agua destilada. Ejemplo, para preparar 30 mL, diluir 3 mL de solución en 27 mL de agua destilada.

Solución de Lavado. PBS-TWEEN 20 (0.05%): Diluir la Solución de Lavado 10X en una proporción 1:10. Ejemplo, para preparar 250 mL, diluir 25 mL en 225 mL de agua destilada.

Conjugado Concentrado: El conjugado es una IgG anti-bovina producida en cabra conjugada con peroxidasa de rábano. Diluir el Conjugado Concentrado a una proporción 1:50 utilizando la solución Diluyente. El conjugado debe diluirse 15 minutos antes de ser utilizado. Una vez diluido la concentración del conjugado es de 1:2000 y no puede volver a almacenarse. Ejemplo, para preparar 5 mL, diluir 100 µl de Conjugado Concentrado en 4.9 mL de solución Diluyente.

Solución de Parada. SDS 4%: Se recomienda mantener la solución a temperatura ambiente para evitar la formación de cristales. En caso de cristalización atemperar la solución 30 minutos antes de su uso a 37°C y homogenizar correctamente. No agitar la solución inmediatamente antes de su uso, para evitar la formación de burbujas.

Controles positivos y negativos de Suero Sanguíneo y Suero de Leche: La producción de controles se realiza en el área de proceso, la cual consta de un espectrofotómetro, un lavador de placas automatizado, una incubadora a 37°C, centrifuga, micropipetas de distintos volúmenes de capacidad, refrigerador. En esta área se seleccionan los sueros individuales para posteriormente elaborar los pools. En ambos casos se realizan las pruebas de Tarjeta 8%, Rivanol, Anillo en leche, IDR, ELISA BruScreen anti LPS y ELISA BruPlus anti-Hapteno Nativo. Los controles son liofilizados como método de conservación. Los controles están liofilizados por lo que deben reconstituirse agregando 1 ml de agua tridestilada o destilada estéril, y agitar suavemente hasta homogenizar por completo. Una vez reconstituido almacenar en refrigeración de 2 a 8°C. Se recomienda hacer alícuotas de los controles y almacenar en congelación las que no estén en uso, para evitar contaminación.

Proceso de la ELISA Indirecta

Es necesario mantener todas las soluciones incluidas a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes de utilizarse y mezclar. Si los controles reconstituidos se encontraban congelados deben descongelarse por completo y agitarse bien antes de usarlos. Distribuir 285 μL del Diluyente de Muestra a cada pocillo en la Microplaca de pre-dilución. Agregar 15 μL de Control Negativo en los pocillos A1 y B; y 15 μL de Control Positivo en los pocillos C1 y D1. Proseguir agregando 15 μL de la muestra (suero sanguíneo o leche) en los pocillos restantes. Tomar 50 μL de las muestras y controles diluidos en la Microplaca de pre-dilución (asegurándose de mezclar bien las muestras y los controles) y pasarlos a la Microplaca antigenizada con Hapteno Nativo, teniendo cuidado en respetar el orden de las muestras. Incubar la Microplaca antigenizada durante 1 hora a 37°C . Posteriormente lavar cada pocillo con 250 μL de la Solución de Lavado previamente diluida evitando que se sequen los pocillos entre cada lavado. Realizar 4 lavados. Eliminar el exceso de la Solución de Lavado sacudiendo la placa dos veces golpeándola suavemente en una superficie plana recubierta con una sanita. Agregar 50 μL del Conjugado previamente diluido (dilución 1:2000) a pocillo. Incubar la Microplaca durante 1 hora a 37°C . Realizar 4 lavados como se mencionó anteriormente y eliminar el exceso de solución. Agregar 50 μL de Sustrato (ABTS), procurando no exponer el Sustrato a la luz cubriendo la Microplaca con papel aluminio para evitar exponer la reacción a la luz. Incubar la Microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) en obscuridad. Finalmente distribuir 50 μL de Solución de Parada y leer una densidad óptica a 405 nm. La lectura es estable durante 30 minutos una vez adicionada la Solución de Parada. El procedimiento anterior se describe en la **Figura 3**.

4.- Selección y liofilización de Controles positivos y negativos de suero sanguíneo y suero de leche.

Localización de Sueros sanguíneo y leche para Controles

Negativos: De las muestras de suero sanguíneo y leche procesadas con la ELISA anti-HN se eligen aquellas muestras que presenten una absorbancia de **0.20 – 0.28**. Se realizan alícuotas del

suero sanguíneo seleccionado en un microtubo Eppendorf previamente identificado. Las alícuotas se almacenan en congelación. En el caso de leche, las muestras se centrifugan a 2500 rpm durante 15 minutos y se elimina la capa superior que contiene grasa, utilizando un aplicador. Una vez desnatadas se realizan las alícuotas y se almacenan en congelación.

Positivos: De las muestras de suero sanguíneo y leche procesadas con la ELISA anti-HN se eligen las muestras que presenten una absorbancia ≥ 1.0 nm. Se realizan alícuotas del suero sanguíneo y se almacenan en congelación. En el caso de leche, se sigue el procedimiento antes de descrito.

Preselección de Controles

Los sueros almacenados en congelación deben pasarse a refrigeración de 2-8°C para evitar un cambio brusco de temperatura. Ya descongeladas se procede a sacarlas del refrigerador y dejar que se atemperen. Las muestras de suero sanguíneo se someten a las pruebas oficiales (Tarjeta al 8% y Rivanol) e IDR. Y las muestras de leche se prueban con Anillo en Leche. Una vez aprobados dichas muestras preseleccionadas se forman los pools de sueros positivos y negativos.

Validación del pool de control positivo y negativo

Los pools de controles se validan una vez más con las pruebas oficiales, IDR y con ELISA-LPS y ELISA-HN. Los pools aprobados pasan a liofilización con un número de lote previamente asignado.

Liofilización de controles positivos y negativos de suero sanguíneo y suero de leche.

Los pools de controles deben alicuotarse en viales de vidrio del mismo tamaño, colocando 1 ml en cada vial previamente rotulado. Se congelan a -80° C por un periodo de 30 min a 1 hora. Posteriormente se colocan en las charolas del liofilizador equilibrando la cantidad de viales en cada lado. Se monitorea la presión y temperatura del liofilizador durante el proceso, la temperatura debe ser de aproximadamente -80° C. El proceso de liofilización deberá llevarse a cabo por lo menos durante 6 horas. Los controles liofilizados pueden almacenarse en refrigeración a 4°C hasta su uso. Los procedimientos de selección y liofilización de los controles se muestran en la **Figura 4**.

PROCEDIMIENTOS SIMILARES A LA INVENCIÓN:

Se realizó una búsqueda para corroborar la existencia de procedimientos similares a la invención, encontrando lo siguiente:

Resumen de procedimientos encontrados, similares a la invención.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Fecha de publicación	1981	1986	1988	1993	1994	1996	1998	1999	2005	2008	
Autor (es)	R. Díaz, et al.	Luis Fernández Lago, Ramón	B. Alonso Umeneta, et al	Efren Díaz Aparicio, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	B. Alonso Umeneta, et al	Marín C.M., et al	Muñoz, P.M., et al	Ricardo Flores, et al	INVENSIÓN
METODO DE LA PRUEBA	Inmuno difusión Radial	ELISA indirecto	ELISA competitivo	Inmuno difusión Radial	ELISA indirecto	Inmuno difusión Radial	ELISA indirecto	Inmuno difusión en Gel de Agar	ELISA indirecta, Inmuno difusión Radial	Fluore scencia polarizada	ELISA indirecto
ESPECIE	Bovina	Humana	Bovina	Bovina, Ovicaprínos	Caprina	Ovino	Bovina, Ovicaprínos	Ovina	Bovina	Caprino	Bovina
Bacteria para producción del antígeno	Brucella melitensis M16	Brucella melitensis M16	Brucella melitensis M16	Brucella melitensis M16; B. abortus 2308; B. abortus 19;Yersinia enterocolitica O:9	Brucella melitensis M16, 115, Rev 1; Brucella abortus 2308; Yersinia enterocolitica O:9	Brucella melitensis M16, Rev 1; Brucella abortus 2308; Yersinia enterocolitic	Brucella melitensis M16, Brucella abortus 2308	Brucella melitensis M16	Brucella melitensis M16	Brucella melitensis, Rev 1	Brucella melitensis M16
Medio de cultivo de la Brucella	Caldo Soya Tripti caseína (TSB)	Caldo Soya Tripti caseína (TSB)	Agar Soya Tripti caseína (TSA)	Caldo Soya Tripti caseína (TSB)	Caldo Soya Tripti caseína (TSB)	Caldo Soya Tripti caseína (TSB)	1.7 % caseína-0.3% soya-0.5 % extracto de levadura-0.25% K2HPO4-2% glucosa, 0.5% NaCl-	Referencia R. Díaz, 1981	Caldo Soya Tripti caseína (TSB)	Agar brucella	Agar Soya Tripti caseína (TSA)
Método de siembra de la Brucella	CALDO: incubación 48 horas a 37°C con agitación	CALDO: incubación en Caldo a 37°C, con agitación	PLACA: incubación 2-3 días, a 37°C	CALDO: incubación a 37°C con agitación	CALDO: incubación a 37°C con agitación 200 rpm	CALDO: incubación 24 horas a 37°C con agitación	1.5 litros en Fermentador Biostat, 36 h, 35% O2	Referencia R. Díaz, 1981	CALDO: incubación 48 horas a 37°C con agitación	PLACA: incubación 48 horas, a 37°C	PLACA: incubación 3-5 días, a 37°C, CO2 al 5%
Método de inactivación pre-cosecha	Fenol al 0.5% a 37°C por 24 horas	Fenol al 0.5% a 37°C por 24 horas	Fenol al 0.5% a 37°C por 24 horas	Fenol al 0.5% a 37°C por 24 horas	no aplica	no aplica	Fenol al 0.5% a 36°C por 48 horas	Referencia R. Díaz, 1981	no especifica	Fenol al 0.5% a 37°C por 24 horas	no aplica
Método de cosecha de la Brucella	Centrifugació n a 12000 xg, 30 minutos, 5°C	Centrifugació n a 12000 xg, 30 minutos, 5°C	Centrifugaci ón a 12000 xg, 30 minutos, 5°C	Filtración tangencial	Filtración tangencial	Filtración tangencial	Filtración tangencial	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	Centrifugación	Recolección con azadas
Técnica de lavado de la cosecha	2 lavados en solución salina	2 lavados en solución salina	2 lavados en solución salina	2 lavados en solución salina	2 lavados en solución salina	no aplica	2 lavados en solución salina	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	no aplica	1-2 lavados en solución salina (6000 rpm por 30 minutos)
Solución para resuspender la cosecha	Agua destilada	Agua destilada	Agua destilada	Agua destilada	Agua destilada	Agua destilada	no especifica	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	Agua destilada	Solución salina
Método de inactivación post-cosecha	Esterilización a 120°C, 30 minutos	Esterilización a 120°C, 30 minutos	Esterilizació n a 120°C, 30 minutos	Esterilización a 120°C, 30 minutos	Fenol 0.5% a 37°C por 24 horas.	Esterilización a 120°C, 15 minutos	no especifica	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	Esterilización a 120°C, 15 minutos	Esterilización a 120°C, 15 libras, 25 minutos

Resumen de procedimientos encontrados, similares a la invención.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Fecha de publicación	1981	1986	1988	1993	1994	1996	1998	1999	2005	2008	
Autor (es)	R. Díaz, et al.	Luis Fernández Lago, Ramón Díaz.	B. Alonso Umeneta, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	B. Alonso Umeneta, et al.	Marín.C.M., et al.	Muñoz, P.M., et al.	Ricardo Flores, et al.	INVENION
Método de Extracción y Precipitación	no aplica	no aplica	Agua caliente 120 °C	no aplica	Esterilización a 120°C, 15 minutos	no aplica	Agua caliente 100 °C	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	no aplica	no aplica
	Centrifugación: 12000 g, por 30 minutos, a 5°C	Centrifugación: 12000 g, por 24 minutos, a 5°C	no especifica	Centrifugación: 12000 g, por 30 minutos, a 5°C	Centrifugación	Centrifugación: 12000 g, por 15 minutos	no especifica	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	Centrifugación	Centrifugación: 6000 rpm por 30 minutos
	3X-Etanol por 18 horas a 5°C, con agitación	3X-Etanol por 24 horas a 4°C	3X-Etanol por 18 horas a 4°C, con agitación	Referencia R. Díaz, 1981	3X-Etanol	3X-Etanol por 18 horas a 4°C, con agitación	3X-Etanol por 18 horas a 4°C, con agitación	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	3X-Etanol por 18 horas a 4-8°C, con agitación	3X-Etanol por 18 horas a 4°C, con agitación
	Centrifugación: 5000 g, por 15 minutos, a 5°C	Centrifugación: 5000 g, por 15 minutos, a 5°C	Centrifugación: 5000 g, por 15 minutos, a 4°C	Referencia R. Díaz, 1981	no especifica	Centrifugación: 5000 g, por 10 minutos, a 4°C	no especifica	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	Centrifugación	Centrifugación: 6000 rpm por 30 minutos
	2X-Etanol por O/N a -20°C	2X-Etanol por O/N a -20°C	2X-Etanol por O/N a -20°C	Referencia R. Díaz, 1981	2X-Etanol	2X-Etanol por 18 horas a -20°C	2X-Etanol por O/N a -20°C	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	2X-Etanol por 18 horas a -20°C	2X-Etanol por 18 horas a -20°C
	Centrifugación: 5000 g, por 15 minutos, a 5°C	Centrifugación: 5000 g, por 15 minutos, a 5°C	Centrifugación: 5000 g, por 15 minutos, a 4°C	Referencia R. Díaz, 1981	no especifica	Centrifugación: 5000 g, por 5 minutos, a 5°C	no especifica	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	Centrifugación	Centrifugación: 6000 rpm por 30 minutos
Solución para resuspender el pellet del antígeno HN	Agua destilada	Agua destilada	no especifica	no especifica	no especifica	no especifica	no especifica	Referencia R. Díaz, 1981	Referencia R. Díaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	no especifica	Solución salina

Resumen de procedimientos encontrados, similares a la invención.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Fecha de publicación	1981	1986	1988	1993	1994	1996	1998	1999	2005	2008	
Autor (es)	R. Diaz, et al.	Luis Fernández Lago, Ramón Díaz.	B. Alonso Urmeneta, et al	Efren Diaz Aparicio, et al.	Efren Diaz Aparicio, et al.	Efren Diaz Aparicio, et al.	B. Alonso Urmeneta, et al	Marín.C. M., et al	Muñoz, P.M., et al	Ricardo Flores, et al	INVENCIÓN
Purificación	Dialisis contra agua destilada	Filtradón en 40 mg HN crudo en 2.5 ml Tris HCL	100 mg del 2º ppto. En 50 ml de SDS 4 %	Digestion con nucleasas, DNAsas y RNAsa, 18 h 37 °C	Digestion con nucleasas y proteinasa K	Dialisis contra agua destilada	Digestion con nucleasas y proteinasa K	Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998	Dialisis contra agua destilada	HAPTENO NATIVO CRUDO (SIN PROCESO DE PURIFICACIÓN)
		Cromatografía con Sephacryl S300	Incubación baño maría 15 min	Dialisis contra acetato de sodio 0.1 M	Ultracentrifugación		Ultracentrifugación 200,000 g 6 h, 10 °C	Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998		
		Fraccionamiento en membrana PM30	Removio complejos de LPS con acetato de potasio 5 %	Digestion con B-D-glucosido glucohidrolasa 18 h 37 °C	Extracción con fenol		Cromatografía	Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998		
		Dialisis contra agua dest. 3 días a 4 °C	Incubción 4 °C por 12 h	Proteinasa K 1 h 55 °C 2 veces	Precipitación con etanol		Dialisis	Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998		
		no aplica	Centrifugación: 5000 g por 10 minutos, a 4°C	Ultracentrifugadón 6 h, 200,000 g	Dialisis contra agua destilada		Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998			
			5 volúmenes de etanol	1 volumen de fenol 70 °			Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998			
			Se suspendio el precipitado en 150 ml agua dest.	Centrifugación 9000 g 15 min			Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998			
			Se trato 2 veces con 4 g de Dowex 1X4-200	5 volúmenes de etanol -20 °C overnight			Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998			
			Dialisis	7 volúmenes de etanol -20 °C overnight			Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998			
			Liofilizo	Dialisis			Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998			
			Disolución en 10 mM borato-NaOH	Dialisis			Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998			
			Cromatografía 10 ml por h, columna P300 bio gel con buffer borato				Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998			
			Recolección de fracciones de hapteno				Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998			
			Precipitación con 5 vol. etanol				Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998			
		Dialisis	Referencia a R. Diaz, 1981	Referencia R. Diaz, 1981; Referencia a B. Umeneta, et al, 1998							
Liofilización del antígeno	Si	Si	Si	Si	no especifica	Si	Si		no especifica	Si	Si

HAPTENO NATIVO CRUDO (SIN PROCESO DE PURIFICACION)

Resumen de procedimientos encontrados, similares a la Inversión.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Fecha de publicación	1981	1986	1988	1993	1994	1996	1998	1999	2005	2008	
Autor (es)	R. Díaz, et al.	Luis Fernández Lago, Ramón Díaz.	B. Alonso Urmeneta, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	B. Alonso Urmeneta, et al.	Marín, C.M., et al.	Muñoz, P.M., et al.	Ricardo Flores, et al.	INVERSIÓN
PROCESO DE LA ELISA:											
Sensibilización											
Concentración de Antígeno por ml de diluyente		20 µg/ml	1-2.5 µg/ml		2.5 µg/ml		2.5 µg/ml		2.5 µg/ml		20 µg/ml
Diluyente		Acetato barbitálico pH 4.6, con azida de Na 0.02%	60 mM CABI pH 9.6		PBS 10 mM pH 7.2		CABI pH 9.6; PBS 7.2		PBS		CABI
Volumen de dilución de antígeno por pozo		100 µl	no especifica		100 µl		no especifica		no especifica		50 µl
Concentración de antígeno por pozo		2 µg	no especifica		0.25 µg		no especifica		no especifica		1 µg
1ª Incubación		12 h 37 °C	Over Night 37 °C		Over Night 4 °C		Over Night 37 °C; 4 °C		Over Night 4 °C		Over Night 4 °C
Solución de 1ª lavado	no aplica	Sol. Salina Tween 20 (0.05%)	no especifica	no aplica	PBS Tween 20 (0.05%)	no aplica	PBS Tween 20 (0.05%)	no aplica	PBS Tween 20 (0.05%)	no aplica	PBS Tween 20 (0.05%)
Cantidad de lavados		3	no especifica		4		4		3		4
Volumen de solución de lavado por pozo		no especifica	no especifica		no especifica		no especifica		no especifica		250 µl
Solución de bloqueo		no especifica	no especifica		no especifica		no especifica		no especifica		Sol. De leche descremada al 3%
2ª Incubación		no especifica	no especifica		no especifica		no especifica		no especifica		1 h a 37 °C
Solución de 2ª lavado		no especifica	no especifica		no especifica		no especifica		no especifica		PBS Tween 20 (0.05%)
Cantidad de lavados		no especifica	no especifica		no especifica		no especifica		no especifica		4
Volumen de solución de lavado por pozo		no especifica	no especifica		no especifica		no especifica		no especifica		250 µl
Almacenamiento		no especifica	no especifica		4 °C		4 °C		no especifica		2-8 °C
Preparación de muestras											
Tipo de muestra	Suero sanguíneo	Suero sanguíneo	Suero sanguíneo / Suero de leche	Suero sanguíneo	Suero sanguíneo	Suero sanguíneo	Suero sanguíneo	Suero sanguíneo	Suero sanguíneo	Suero sanguíneo	Suero sanguíneo y leche (suero o entera, tanque o por animal)
Tratamiento de muestra		Inactivación de sueros positivos a 56 °C por 30 min	no aplica		no aplica		no aplica		no aplica		no aplica
Predilución de la muestra		SI	SI		SI		SI		SI		SI
Cantidad de muestra	no aplica	no especifica	no especifica	no aplica	no especifica	no aplica	no especifica	no aplica	no especifica	no aplica	15 µl
Diluyente de muestra		PBS pH 7.2- albumina 0.5%	no especifica		PBS Tween 0.05%		PBS Tween 0.05%		PBS Tween 0.05%		CABI
Cantidad de diluyente		no especifica	no especifica		no especifica		no especifica		no especifica		285 µl
Reto											
Cantidad de muestra diluida por pozo		100 µl	50 µl		no especifica		100 µl		100 µl		50 µl
Especificaciones de competencia del ELISA competitivo	no aplica	no aplica	50 µl de molécula heteróloga (con centr. 200 µg/ml)	no aplica	no aplica	no aplica	no aplica	no aplica	no aplica	no aplica	no aplica
Volumen final por pozo		100 µl	100 µl		no especifica		no especifica		no especifica		50 µl
Incubación		1 h 37 °C	no especifica		1 h 37 °C		1 h 37 °C		1 h 37 °C		1 h 37 °C
Lavados											
Solución de lavado		Sol. Salina Tween 20 (0.05%)	no especifica		PBS Tween 0.05%		PBS Tween 0.05%		PBS Tween 0.05%		PBS Tween 0.05%
Cantidad de lavados	no aplica	3	no especifica	no aplica	4	no aplica	4	no aplica	3	no aplica	4
Volumen de solución de lavado por pozo		no especifica	no especifica		no especifica		no especifica		no especifica		250 µl

Resumen de procedimientos encontrados, similares a la invención.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Fecha de publicación	1981	1986	1988	1993	1994	1996	1998	1999	2005	2008	
Autor (es)	R. Díaz, et al.	Luis Fernández Lago, Ramón Díaz	B. Alonso Urmeneta, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	Efren Díaz Aparicio, et al.	B. Alonso Urmeneta, et al.	Marín C.M., et al.	Muñoz, P.M., et al.	Ricardo Flores, et al.	INVENSON
Conjugado											
Tipo de conjugado	no aplica	IgG,IgA,IgM anti humana (goat)	IgG anti-rabbit (goat)	no aplica	IgG anti-sheep policlonal (rabbit) ; Proteína G recombinante	no aplica	IgG anti-sheep (rabbit); IgG anti-bovine; IgG anti-ruminant; Proteína G recombinante	no aplica	Proteína G recombinante	no aplica	IgG anti-bovino (goat)
Diluyente de conjugado		no especifica	no especifica		PBS Tween (0.05%)		PBS Tween (0.05%)		PBS Tween (0.05%)		CABI
Concentración del conjugado		1:600	no especifica		IgG: 1:2000 ; Proteína G : 0.2 µg/ml		IgGs 1:1000-1:2000; Proteína G: 0.2 µg/ml		0.2 µg/ml		1:2000
Volumen final de conjugado por pozo		100 µl	no especifica		100 µl		100 µl		100 µl		50 µl
Incubación		1 h 37 °C	no especifica		1 h 37 °C		1 h 37 °C		1 h 37 °C		1 h 37 °C
Lavados	no aplica	Sol. Salina Tween 20 (0.05%)	no especifica	no aplica	no especifica	no aplica	no especifica	no aplica	PBS Tween (0.05%)	no aplica	PBS Tween 0.05%
Solución de lavado		3	no especifica		no especifica		no especifica		3		4
Cantidad de lavados		no especifica	no especifica		no especifica		no especifica		no especifica		250 µl
Volumen de solución de lavado por pozo											
Substrato											
Nombre del substrato	no aplica	5-AS	5-amino-2-hidroxi ácido benzoico al 0.09%	no aplica	ABTS	no aplica	ABTS 0.1 %	no aplica	ABTS	no aplica	ABTS
Diluyente del substrato		H2O2	H2O2		Buffer citrato 0.05 M(pH4.0) y H2O2 al 0.004%		Buffer citrato 0.05 M(pH 4.0) y H2O2 al 0.004%		Buffer citrato 0.05 M(pH4.0) y H2O2 al 0.004%		no aplica
Cantidad por pozo		100 µl	no especifica		100 µl		100 µl		no especifica		50 µl
Condiciones de incubación del substrato		1 h, Temp. ambiente en oscuridad	no especifica		15 min, 20 °C		15 min, 20 °C		30 min, 20 °C		15 min, 20-23 °C, en oscuridad
Parada de la reacción											
Solución de parada	no aplica	NaOH 1N	no especifica	no aplica	no especifica	no aplica	no especifica	no aplica	no aplica	no aplica	SDS 4%
Cantidad		0.025 ml	no especifica		no especifica		no especifica				50 µl
Tiempo de estabilidad		no especifica	no especifica		no especifica		no especifica				30 min
Lectura de Densidades Ópticas											
Nanómetros	no aplica	450	450	no aplica	405	no aplica	405	no aplica	no especifica	no aplica	405
Lifilización de controles											
Densidad óptica para selección de control Positivo	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	±1.0
Densidad óptica para selección de control Negativo	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	0.20-0.25
Uso del proceso de Lifilización para Control negativo y Control Positivo	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	no lo utiliza	Uso del proceso de Lifilización para Control negativo y Control Positivo

Trabajo realizado en la aplicación del KIT:

En el estudio realizado en el año 2005 por un grupo de investigadores internacionales (*incluido el Dr. Bruno Garin-Bastuji, representante del Laboratorio de Referencia para Brucelosis en la Unión Europea y de la OIE/ FAO*) utilizó con gran éxito la ELISA Hapteno Nativo y reconoce que las pruebas serológicas que detectan anticuerpos anti **LPS-O** pueden generar “**Falsos Positivos**” por **reacciones cruzadas** con bacterias Gram negativas incluyendo: ***Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* O:9**, siendo *Yersinia* la causa más frecuente y significativa de “falsos positivos”, ya que sus niveles de anticuerpos anti LPS-O en **suero y leche** que cruzan con *Brucella*, suelen ser **altos, persistentes y fluctuantes**. La reacción cruzada entre *Yersinia* y *Brucella* se debe a su **fuerte similitud de las cadenas de LPS-O**. Este estudio referenció 68 artículos científicos, y reconoce hasta un **15% de “falsos positivos” en zonas libres de la Unión Europea** y que, en programas avanzados de erradicación se requiere un diagnóstico diferencial con una **prueba confirmatoria diferente a LPS-O** ⁽³¹⁾.

El KIT motivo de la presente solicitud, ya fue probado en campo en muchos y variados diseños estadísticos. Uno de dichos estudios, fue un ciclo completo de producción, con duración de doce (12) meses, en un establo con **2533 vacas lecheras (100%)** en ordeña localizadas en Torreón, Coahuila México, región de alta incidencia de brucelosis, y a las cuales se le realizaron todas las pruebas convencionales que miden **anti LPS-O**, tanto en suero sanguíneo como en leche. Dichas pruebas convencionales generaron un total de **741 animales positivos**, es decir, el **29.25%** de las vacas en producción.

En la mitad de esos animales, esa positividad a LPS-O fue **Fluctuante** durante los 12 meses del estudio.

Este KIT se utilizó como prueba confirmatoria, a través del cual se mide la respuesta a un segundo anticuerpo específico de brucelosis, el Hapteno Nativo, resultando el **15.24%** de “Falsos Positivos” (386 animales) generados por reacción cruzada con otras bacterias, y un 14.02% de verdaderamente infectados (355 animales positivos al KIT de ELISA anti HN).

El 15% de "Falsos Positivos" emitidos por todas las pruebas convencionales que miden anti LPS-O, en suero sanguíneo o leche, genera una gran pérdida económica para la ganadería mundial.

Estos resultados se muestran en la **Figura 5**.

Durante este periodo de doce meses también fue monitoreado semanalmente el tanque de leche de las 2533 vacas en producción, utilizando una ELISA comercial y Anillo en leche, ambas pruebas miden anticuerpos anti LPS-O, y emitiendo los mismos "Falsos Positivos" de manera fluctuante. La leche también fue confirmada con el mismo KIT de la presente solicitud, lo que permitió corroborar la presencia del anticuerpo anti Hapteno Nativo. Por lo tanto, utilizar este KIT para monitoreo de tanque de leche, permite identificar una leche verdaderamente brucelosa, descartando leche "Falsa Positiva" debida a reacciones cruzadas por otras bacterias.

MEJOR MÉTODO PARA REALIZAR LA INVENCION

Hapteno Nativo Crudo

Se realizó la extracción del HN con el método tradicional mencionado en los antecedentes de la presente solicitud. El pellet del antígeno se resuspendió en solución salina y se probó en crudo (sin purificación) por las pruebas de IDR y ELISA indirecta anti-HN contra sueros sanguíneos positivos confirmados con las pruebas oficiales de la NOM-041-ZOO-1995. En este ensayo se obtuvieron resultados favorables, por lo que se decidió probar el extracto crudo con muestras de leche en la ELISA indirecta anti-HN, en donde también se obtuvo un resultado favorable. Por lo que se concluyó que no es necesario una purificación del antígeno para la sensibilización de las placas.

Concentración HN

Se realizaron distintas diluciones del antígeno, se sensibilizó en placa, se probaron sueros y se encontró que era la mejor concentración para antigenizar. La estandarización de la prueba de

ELISA se realizó con la titulación del antígeno Hapteno Nativo (HN) para determinar el valor óptimo de concentración del antígeno con la cual debe sensibilizarse la placa.

La titulación del antígeno tomó como punto de referencia la concentración óptima de antígeno de la prueba de Inmunodifusión Radial (IDR), la cual es 2 mg/mL. A partir de esta concentración se realizó una serie de diluciones (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32; 1:64; 1:100 y 1:128) con buffer CABI. Se agregaron 50 µl de cada dilución del antígeno a la placa, es decir distribuyendo una dilución por cada fila, de modo que cada dilución estuvo presente en 12 pocillos de la placa. Posteriormente se prosiguió con el protocolo de sensibilización.

Se seleccionaron 4 muestras de sueros positivos y 4 muestras de sueros negativos las cuales se corrieron en placa de ELISA por triplicado. De las absorbancias obtenidas se obtuvieron los promedios de los sueros positivos y los negativos para establecer el punto de corte que permitiera diferenciar absorbancias negativas de positivas.

El criterio empleado fue el siguiente: Para considerar una muestra positiva, la lectura de densidad óptica se encontraba por encima del rango del promedio de los negativos más tres desviaciones estándar ($0.5432 + 3(0.1521) = 0.9995$). Tomando como referencia este punto de corte, se determinó que la concentración óptima de antígeno en la placa corresponde al valor que se acerque a la densidad óptica de 0.9995, menos una dilución de antígeno. Estableciendo así la dilución 1:100 en el caso del antígeno lo cual corresponde a **1 microgramo por pozo**.

Utilización de IgG anti-bovina (cabra)

Para buscar el mejor anticuerpo secundario, se revisó la literatura citada anteriormente, en donde se encontraron reportes sobre distintos tipos de inmunoglobulinas empleadas en métodos de ELISA en diferentes especies animales, incluida la bovina. Se determinó que para obtener una mejor eficiencia de la prueba dirigida a bovinos es necesario la utilización de una IgG anti-bovina.

Hapteno Nativo en Leche

Con la finalidad de determinar el límite mínimo de detección de leche positiva en un tanque de leche negativo, se realizaron 92 diluciones, iniciando con una proporción de 1:1 de leche positiva en negativa. La muestra de leche positiva provenía de una vaca confirmada positiva a *Brucella*, con la mayor positividad presentada en las pruebas de Anillo en Leche, Tarjeta 8%, Rivanol (1:400), Inmunodifusión Radial (IDR) y ELISA indirecta con HN. Estas ELISAS se le realizaron tanto en suero sanguíneo como en suero de leche. La leche negativa fue obtenida de un pool de nueve vacas negativas a las pruebas mencionadas.

De las 92 diluciones que se corrieron, la ELISA indirecta anti-HN fue capaz de detectar el nivel de positividad hasta la dilución número 27 correspondiente a la cantidad de 969.162 litros de leche positiva en un tanque de leche con un volumen de 29,030.838 litros de leche negativa, dando un total de 30,000 litros. La positividad de las 27 diluciones estudiadas se confirmó por la prueba de Anillo en Leche, demostrando la eficiencia de la prueba en este tipo de muestras.

Rango de Densidad Óptica (DO) de controles y su liofilización

Los controles obtenidos de muestras de suero sanguíneo y de leche provenientes de animales se preseleccionaron con base en su historia clínica y resultado positivo o negativo en las pruebas oficiales de Rosa de Bengala (tarjeta 8%), Rivanol, y Anillo en leche, así como en Fluorescencia Polarizada (FPA) e Inmunodifusión Radial (IDR).

A los sueros seleccionados, se les realizó la prueba de ELISA indirecto anti-HN, y en base a los resultados se eligieron aquellas muestras que presentara una absorbancia ≥ 1.000 para control positivo y de 0.20 – 0.28 para control negativo. Se conformaron 2 pools de sueros, uno de control positivo y otro de negativo, a los cuales se les realizaron las pruebas oficiales, IDR y ELISA indirecto, para comprobar su positividad y negatividad. Una vez aprobados los pools de controles se pasaron a proceso de liofilización.

Se tomaron dos viales de controles liofilizados, uno con control positivo y otro con control negativo. Se reconstituyeron con 1 mL agua tridestilada estéril y se homogenizaron perfectamente. Para comprobar su estabilidad una vez reconstituidos se analizaron mediante las pruebas serológicas oficiales que marca la norma NOM-041-ZOO-1995 así como IDR y la prueba ELISA indirecta anti-HN. Cada 15 días se les realizaron las pruebas antes mencionadas. Dichos controles reconstituidos se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

Se confirmó la estabilidad de los controles observando una concordancia de 1 (uno) entre las 5 pruebas, es decir, el control positivo fue positivo a las 5 pruebas y el control negativo fue negativo a las 5 pruebas. Encontrando que las densidades ópticas son estables.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DEL KIT

Preparación de medios y soluciones

Las soluciones para elaborar el kit se preparan con el procedimiento descrito a continuación.

Medio Agar Soya Trypticaseína (TSA): Para preparar 1 L de medio TSA. Pesar 40 g/L de TSA y disolver en 1 L de agua destilada, el medio debe disolverse calentando al mechero hasta hervir, posteriormente se esteriliza en autoclave a 120°C y 15 lb durante 15 minutos. Una vez esterilizado el medio se deja enfriar y antes de solidificar se vierte en placas de Petri, vertiendo 5 mm de grosor aproximadamente en cada placa. Se deja solidificar y se almacenan las placas bien selladas a 4°C. Esto último debe trabajarse en una campana de flujo laminar, o en presencia de un mechero Fisher.

Solución Salina (NaCl 0.9%): Para preparar 1 L de solución salina. Pesar 9 g de cloruro de sodio y disolverlo en 1 L de agua destilada, mezclando perfectamente. Esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb durante 15 minutos.

Solución de bloqueo: Se prepara una solución de leche descremada al 3%. Pesando 3 g de leche descremada en polvo y se disuelven en 100 ml de agua destilada estéril, disolviendo completamente.

Solución Diluyente de Muestra (10x) y diluyente de conjugado (1x). Buffer Carbonato-Bicarbonato (CABI): Como diluyente se utiliza un buffer CABI a un pH de 9.6. 10x, las cantidades a 1X cambian en proporción. Pesar 35.6 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y disolver con agua destilada. Agregar 84 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y disolver. Agregar 2 g de azida de sodio (NaN_3) como conservador y disolver. Ajustar el pH de la solución a 9.6, utilizando ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH).

Aforar a 1 L y filtrar la solución con papel filtro. Esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb por 15 minutos y etiquetar con nombre, número de lote y fecha de elaboración.

Solución de Lavado. PBS-Tween 20 (0.05%): Pesar 14.4 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) y disolver en agua destilada utilizando un agitador. Pesar 2.2 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y agregarlo, agitando hasta que se disuelva perfectamente. Agregar más agua si es necesario. Agregar 2 g de cloruro de potasio (KCl) y disolver perfectamente. Agregar 80 g de cloruro de sodio (NaCl) a la solución y agitar hasta disolver perfectamente, la solución deberá quedar cristalina. Ajustar el pH de la solución a 7.4, utilizando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Aforar a 1 L y agitar bien la solución. Filtrar la solución utilizando papel filtro y esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb por 15 minutos. Al enfriarse, agregar 5 ml de tween-20, agitando suavemente. Vaciar en un frasco y etiquetar el frasco con nombre, número de lote y fecha de elaboración.

Solución de parada. SDS 4%: Como solución de parada se utiliza Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 4%. Pesar 40 g de SDS. Mezclar con agua destilada hasta disolver y forar a 1 L. Si no se disuelve del todo debe calentar la solución hasta que este tibia, aproximadamente a 37°C hasta disolver perfectamente. Esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb por 15 minutos. Vaciar en un frasco y rotular con nombre, número de lote y fecha.

Sustrato: Como sustrato se utiliza una solución de ácido 2,2' – azino - bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

Referencias bibliográficas

1. Brucellosis. Medical microbiology. INRA. 28:512-525.
2. Arzola, V. E. A., González, M. A., González, J. L. I., Hernández, M. L., Aparicio, E. D., Moorillón, G. V. N., & River, B. E. (2012). Diagnóstico rápido y efectivo de brucelosis bovina en sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa doble. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 46(2), 147-158.
3. Aparicio, E. D. (2013). Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Revue Scientifique et Technique*, 32(1), 43–51.
4. Esperanza González, M., Hernández Andrade, L., & Díaz Aparicio, E. (2006). Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para diferenciar bovinos con revacunaciones repetidas con la cepa S19 de *Brucella abortus*, 44, 269–276.
5. E.Herrera López, L. Hernández Andrade, G. P. R. and E. D. A. (2007). Study of Brucellosis Incidence in a Bovine Dairy Farm Infected with *Brucella abortus*, Where Cattle Was Revaccinated with RB51. *International Journal of Dairy Science*. 2(1): 50-57.
6. Herrera, E., Palomares, G., & Díaz-Aparicio, E. (2008). Milk production increase in a dairy farm under a six-year brucellosis control program. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, 296–299.
7. Leal-hernández, M., Jaramillo-meza, L., & Hernández-andrade, L. (2007). Producción de interferón gamma en cultivos de sangre completa en respuesta a antígenos de *Brucella abortus* en bovinos vacunados con RB51 Production of interferon gamma in whole blood cultures in response to *Brucella abortus* antigens in RB51-vaccinated cat, 45(2), 147–159.
8. María Dolores Fuentes Delgado, Irene V. Vitela Mendoza, Beatriz Arellano-Reynoso, Rigoberto Hernández Castro, José Francisco Morales Álvarez, Carlos Cruz-Vazquez. (2007).

Presence of *Brucella abortus* vaccinal strain RB51 in Vaginal Exudates of abortaded cows. Research Journal of Dairy Sciences, 1 (1-4): 13-17.

9. Aparicio-Bahena, A., Díaz-Aparicio, E., Hernández-Andrade, L., Pérez-González, R., Alfonseca-Silva, E., & Suárez-Güemes, F. (2003). Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. *Técnica Pecuaria*, 41(2), 129–140.

10. A., Castro, A., González, H. A; Prat, S. R.; & Baldi, P. C. (2006). Detección de anticuerpos anti-*Brucella spp.* en cerdos mediante técnicas de aglutinación y ELISA indirecto en las provincias de Buenos Aires y La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 38: 75-78.

11. Kittelberger R, Hilbink F, Hansen MF, Penrose M, de Lisle GW, Letesson JJ, et al. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9. Immunoblot analysis of the antibody response to *Brucella* protein antigens in bovine brucellosis. (1995). *Vet Microbiol*; 47: 257-70.

12. Rodriguez, A., Orduña, A., Ariza, X., Morivon, I., Diaz, R., Blasco, J., Almaraz, A., Martinez, F., Ruiz, C. y Abad, R. (2001). Manual de Brucelosis. Ed. Junta de Castilla y Leon. Copyright. Zamora, España.

13. Abernethy D.A., Moscard-Costello J., Dickson E., Harwood R., Burns K., McKillop E., McDowell S, & Pftffer D.U. (2011). - Epidemiology and management of a bovine brucellosis cluster in Northern Ireland. *Prev. vet. Med.*, 98 (4), 223-229.

14. Bustamante Sánchez, J., Hernández Salazar, I., Díaz, A. E., Mazano Cañas, C., Pérez González, R., & Andrade, L. H. (2000). Estudio Bacteriológico Y Serológico De Brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. *Inifap*, (5).

15. Cantú, A., Díaz, E., Andrade, L. H., Adams, G. L., & Güemes, F. S. (2007). Estudio epidemiológico de un hato bovino con prevalencia media de brucelosis, vacunado con las mutantes rugosas de. *Group*, 38(2), 197–206.

16. Diaz, R., P. Garatea, L. M. Jones, and I. Moriyon. (1979). Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J. Clin. Microbiol.* 10:37-41.
17. Moriyón UI. *Brucella* cell structure. In: Memory to 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago ILL, USA November 8-9 1997: 3-18.
18. Moriyon, I. et al. (1998). Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Internatl Microbiol*, 19–26.
19. Alonso-Urmeneta, B., Moriyon, I., & Blasco, J. M. (1988). Enzyme-linked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polysaccharide and smooth lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Microbiology*.
20. Dubray, G. (1984). Progrès récents sur la biochimie et les propriétés biologiques des antigènes de *Brucella*. *Dev. Biol. Stand.* 56:131-150.
21. Stemshorn, B. W. (1984). Recent progress in the diagnosis of brucellosis. *Dev. Biol. Stand.* 56:325-340.
22. Organizacion Mundial de Sanidad Animal. (2000). Brucelosis bovina, 1-8.
23. Diaz, R., Toyos, J., Salvó, M. D., & Pardo, M. L. (1981). A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. *Annales de Recherches Veterinaires. Annals of Veterinary Research*, 12(1), 35–39.
24. Fernandez-Lago, L., & Diaz, R. (1986). Demonstration of antibodies against *Brucella melitensis* 16M lipopolysaccharide and native hapten in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*.
25. Alonso-Urmeneta, B., Moriyon, I., & Blasco, J. M. (1988). Enzyme-linked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polysaccharide and smooth lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(12), 2642–2646.
26. Diaz-Aparicio E, Aragon V, Marin C, Alonso B, Font M, Moreno E, et al. Comparative analysis of *Brucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for

serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(12):3136–41.

27. Díaz-Aparicio, E., Marin, C., Alonso-Urmeneta, B., Aragón, V., Pérez-Ortiz, S., Pardo, M., Moriyón, I. (1994). Evaluation of Serological Tests for Diagnosis of *Brucella melitensis* Infection of Goats. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5), 1159.

28. Díaz-Aparicio, E., Uria, I. M., Blasco-Martinez, J. M., Marin-Alcala, C., & Diaz, R. (1996). Diagnóstico de *Brucella melitensis* en ovinos usando inmunodifusion radial con hapteno nativo. *Técnica Pecuaria En México*, 34(2), 99–103.

29. Alonso-Urmeneta B, Marín C, Aragón V, Blasco JM, Díaz R, Moriyón I. Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. 1998; 5(6):749–54.

30. Marín, C. M., Moreno, E., Moriyón, I., Díaz, R., & Blasco, J. M. (1999). Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(2), 269–272.

31. Muñoz, P.M., C.M. Marín, D. Monreal, D. Gonzalez, B. Garín-Bastuji, R. Díaz, R.C. Mainer-Jaime, I. Moriyón, and **J.M. Blasco**. (2005). Efficacy of Several Serological Tests and Antigens for Diagnosis of Bovine Brucellosis in the Presence of False-Positive Serological Results Due to *Yersinia enterocolitica* O:9 American Society for Microbiology. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. 2005; 12(1):141–51.

32. WO2008051065 A1, fecha de presentación: OCT16, 2007. Fecha de publicación: Mayo 2, 2008. Universidad Autónoma de Nuevo León.

<https://www.google.com/patents/WO2008051065A1?cl=es>

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En la **figura 1** se muestra el diagrama de flujo del proceso de la obtención del antígeno Hapteno Nativo. Desde la siembra de la cepa *B. melitensis* 16M, la cosecha de las células y la extracción del antígeno hasta la liofilización del antígeno obtenido.

En la **figura 2** se observa el diagrama de flujo del proceso de sensibilización de las placas de ELISA. Este diagrama describe los pasos que se llevan a cabo para sensibilizar las placas con el antígeno Hapteno Nativo.

En la **figura 3** se observa el diagrama de flujo del proceso de la ELISA indirecta de, en el cual se describen los pasos a realizar en la prueba.

En la **figura 4** se observa el diagrama de flujo del proceso de obtención de los controles de suero sanguíneo y leche. Señalando las condiciones por las cuales se eligen los controles y su validación antes de ser liofilizados.

En la **figura 5** se observa el resultado del uso de este KIT en un establo de 2533 vacas lecheras en producción, y sus resultados a las pruebas convencionales, así como aquellos animales "Falsos Positivos" y los realmente infectados.

REIVINDICACIONES

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 Crudo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque, caracterizado por diez (10) microplacas antigenizada 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. Incluye 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 Sustrato, el cual es ABTS (es un producto comercial); 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 (es un producto comercial) el cual está prediluido en el conservador HRP Protector, que es 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. Todos los viales de controles para su reconstitución en un (1) mililitro de agua destilada.

2. Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de Hapteno nativo Crudo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque que emplea este antígeno crudo obtenido de una cepa de *B. melitensis* 16M, sin ningún tratamiento

de purificación con efectiva capacidad de adherencia para realizar una ELISA indirecta para diagnóstico de brucelosis en suero sanguíneo y leche.

3. Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de Hapteno nativo Crudo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque que se caracteriza porque tal y como se reivindicó en la cláusula anterior, la Sensibilización o Antigenización de placas de ELISA con antígeno Hapteno Nativo a una concentración de 1 microgramo por pozo para diagnóstico de brucelosis en suero sanguíneo y leche.

4. Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base del uso de controles liofilizados para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque que se caracteriza porque tal y como se reivindicó en la primer cláusula, con el uso de controles de suero sanguíneo y leche liofilizados como método de conservación evitando su contaminación y la degradación de los anticuerpos presentes, garantizando la estabilidad de las densidades ópticas en controles positivos y negativos para una correcta interpretación de resultados en una ELISA indirecta.

5. Procedimiento de Selección y Liofilización de Controles positivos y negativos para uso en otras pruebas de diagnóstico.

RESUMEN

Kit de diagnóstico para prueba confirmatoria por el método de ELISA Indirecto que mide los niveles de anticuerpos anti-Hapteno Nativo producidos en una verdadera infección, evitando grandes pérdidas económicas a la ganadería, con el discernimiento de "falsos positivos" los cuales presentan anticuerpos anti-LPS debido a reacciones cruzadas por enterobacterias y anticuerpos posvacunales en el diagnóstico de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque, caracterizado por que utiliza el antígeno Hapteno Nativo crudo, extraído de la cepa *B. melitensis* 16M, sin ningún tratamiento de purificación con efectiva capacidad de adherencia, que es empleado para la sensibilización o antigenización de las placas a una concentración conocida (1 µg por pozo), en donde tomando como referencia controles positivos y negativos sometidos al método de liofilización para garantizar su conservación, evitando la contaminación y la degradación de los anticuerpos presentes, y que garantiza la estabilidad de las densidades ópticas en dichos controles para una correcta interpretación de resultados en una ELISA indirecta. Adicionalmente, presenta el proceso de Liofilización de controles que pueden ser utilizados en otros métodos diagnósticos.