

Procedimientos para la obtención de reactivos biológicos de los estuches DAVIH Ag P24 y DAVIH Ac P24

Nancy M. Ruiz, Giselle Alvarez y Enrique Noa.

Laboratorios DAVIH. Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. San José de las Lajas. La Habana, Cuba. E-mail: cicdc@infomed.sld.cu

La pandemia de SIDA es uno de los problemas actuales más graves que afectan a la humanidad. Como todavía no se cuenta con una vacuna efectiva a pesar de los esfuerzos realizados por científicos en todo el mundo, la utilización de drogas antirretrovirales para mejorar la calidad de vida de los pacientes es lo que ha resultado más exitoso, de ahí la importancia de poseer medios para realizar un diagnóstico temprano de la infección y para monitorear su progresión con el objetivo de poder actuar sobre ella. El presente trabajo describe la obtención de los componentes biológicos que se requieren para la producción de dos estuches que se utilizan en nuestro país en todos los estudios que tienen relación con la infección VIH-SIDA. Para ello se realizó un protocolo que incluyó varias etapas de purificación e inmovilización de diferentes moléculas. Como resultado se obtuvieron la proteína de 24 Kd del VIH-1 y anticuerpos monoclonales y policlonales humanos contra esta proteína, con adecuados grados de pureza y actividad biológica. La combinación de etapas en este protocolo, permitió ir obteniendo productos que además de utilizarse en la etapa siguiente también por sí mismos, algunos de ellos, constituyeron reactivos de los estuches.

Palabras clave: purificación, anticuerpos monoclonales, inmovilización, p24, VIH-1, anticuerpos policlonales humanos.

Introducción

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es la enfermedad que constituye el estadio final en la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Como en sus inicios la infección es asintomática y la aparición de la enfermedad puede tardar varios años, es necesario realizar el pronóstico mediante la utilización de diferentes marcadores clínicos, inmunológicos y virológicos. Los marcadores predictivos brindan información sobre el estado del sistema inmune, el virus y la interrelación entre ellos. Los marcadores clínicos son altamente específicos pero muy tardíos, por tanto no se pueden utilizar como predictores de progresión y se requieren marcadores de laboratorio que posean esta capacidad. Entre los marcadores biológicos se encuentran el recuento de células T CD4+, la antigenemia p24 y las concentraciones elevadas de Ig_2 - microglobulina y neopterin sérica (1, 2). En la actualidad también se utiliza la determinación de la carga viral sobre la base de la técnica de la reacción en cadena de

la polimerasa, sin embargo, en ausencia de dicha técnica y para lograr una mayor eficiencia se recurre a la utilización combinada de marcadores por ejemplo, los anticuerpos contra la p24 (Ac anti p24), el antígeno p24 (Ag p24) y el conteo total de linfocitos CD4+ (3).

La detección de antígeno p24 (proteína principal del núcleo viral) circulante y la titulación de Ac anti p24 han resultado útiles para este fin debido a la dinámica de ellos durante la infección y se utilizan, entre otros, en el seguimiento a largo plazo de seropositivos asintomáticos (4), en el pronóstico y manejo terapéutico de la infección por VIH en la edad pediátrica y en el pronóstico y seguimiento de la infección perinatal por el VIH (3). También es importante la detección del Ag p24 en los sobrenadantes de los cultivos del virus, ya que permite monitorear la replicación viral y cuantificar la concentración de esta proteína (5,6,7).

Actualmente en Cuba se utilizan los sistemas DAVIH Ag P24 y DAVIH Ac P24 (inmunoensayos

basados en la tecnología ELISA, producidos por Laboratorios DAVIH, La Habana, Cuba) como marcadores de pronóstico de la infección por el VIH, para complementar el seguimiento clínico a todos los individuos infectados, debido a que no siempre existe la posibilidad de realizar mediciones de carga viral por métodos de biología molecular, de forma sistemática (8). Además, permiten el monitoreo de aislamientos virales y de ensayos que se llevan a cabo como parte de los estudios de caracterización biológica de las cepas circulantes en nuestro país y de la respuesta inmune *in vitro* de animales de experimentación y voluntarios en las investigaciones de la vacuna contra el VIH que se desarrolla en Cuba (9,10,11).

En el presente trabajo se describe el algoritmo mediante el cual se obtuvieron los reactivos biológicos necesarios para el desarrollo de dichos estuches.

Materiales y métodos

Obtención de líquido ascítico con anticuerpos monoclonales contra la p24

Las células de hibridoma D312 (productora de anticuerpos monoclonales de la subclase IgG_{2b}) mantenidas en congelación, se descongelaron y centrifugaron en medio de cultivo sin suplemento, se sembraron en placas de 24 pozos o en frascos de 25 cm²/50 mL, en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), 1% de L-glutamina 0,002 mol/L y de piruvato de sodio 0,1 mol/L. Cuando las células alcanzaron fase exponencial de crecimiento y viabilidad mayor o igual al 95% (1 x 10⁶ células), se inocularon a ratones Balb/c de 20 g de peso, previamente adyuvados con 0,3 mL/ratón de adyuvante incompleto de Freund, por vía intraperitoneal. Después de 7 días aproximadamente se obtuvo el líquido ascítico por punción peritoneal a los animales y se colectó en tubos de centrifuga de 50 mL, con 20u de heparina por cada 10 mL de líquido ascítico, para posteriormente centrifugar a 400 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Obtención de antígeno inactivado de VIH-1

Células CEM-CCRF clon 17 inoculadas con la cepa de VIH-1 BRU (MOI de 0,1), se sembraron

en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone), 1% de L-glutamina (Flow), 5 µg/mL de Polibrene (Sigma) y 40 µg/mL de gentamicina (Gibco) a 500 x 10³ células/mL en frascos Roller a una velocidad de 1,5 rpm a 37 °C. Los cultivos se cosecharon al tercer día y el sobrenadante aclarado se concentró con PEG-6000 (BDH) al 10% durante 20 horas a 4 °C.

El virus se purificó por gradiente discontinuo de sacarosa de concentraciones 20%-35%-50% a 28 000 rpm (100 000 x g) durante 60 minutos a 4 °C. Las bandas se colectaron y se precipitaron a 45 000 rpm (165 000 x g) durante 30 minutos a 4 °C en solución NTE con 2 mM de PMSF pH 8,5. El precipitado se inactivó con Tritón X-100 al 1% (12).

Procedimientos cromatográficos

Se desarrolló un esquema basado en la combinación de etapas de purificación e inmovilización de diferentes proteínas para la obtención de los reactivos biológicos de los estuches DAVIH Ag P24 y DAVIH Ac P24.

a) Purificación del anticuerpo monoclonal contra la p24 del VIH-1

La purificación del anticuerpo monoclonal contra la p24 (AcM anti p24) del VIH-1 se realizó mediante cromatografía de afinidad. El líquido ascítico previamente filtrado a través de gasa y de membrana de 0,45 µm, se aplicó a una columna cromatográfica con Protein A Sepharose CL-4B (PAS) (Amersham Biosciences AB). Después de lavar la columna con PBS, se procedió a la elución del anticuerpo monoclonal (AcM), con ácido cítrico 0,1 mol/L, pH 4.

La pureza del AcM purificado se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, en presencia de SDS (SDS-PAGE) (reducida y no reducida) para lo que se emplearon patrones de bajo peso molecular (proteínas del VIH-1) y de alto peso molecular (BioRad) y el revelado de las proteínas en el gel se realizó mediante tinción con nitrato de plata (13). La determinación del peso molecular de las cadenas ligera y pesada y de la molécula completa de IgG, se realizó por cálculo de la movilidad relativa (Rf) como se describe en

el instructivo de los patrones de peso molecular de BioRad.

La concentración se estimó por el método de Lowry (14) y la actividad biológica, por Western blot (13), enfrentándose los anticuerpos purificados a antígeno del VIH-1 inmovilizado por electrotransferencia sobre tiras de nitrocelulosa.

Los valores de concentración obtenidos se utilizaron para el cálculo de los parámetros de control del proceso de purificación (15).

b) Inmovilización de AcM anti p24 sobre CNBr activated Sepharose 4B

Se empleó CNBr activated Sepharose 4B (CNBrS) (Farmacia Biosciences) como soporte para inmovilizar los AcM purificados, lo que se realizó según las indicaciones que trae el producto. Al derivado inmovilizado resultante se le denominó AcM-Sefarosa.

El grado de inmovilización se determinó como la diferencia entre la cantidad total de ligando añadido a la mezcla de acoplamiento y la recuperada después de lavar ampliamente.

El rendimiento del acoplamiento se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$y(\%) = \frac{(m_0 - m_s)}{m_0} \times 100 \quad (16)$$

donde:

y : rendimiento del acoplamiento (%)

m_0 : cantidad de proteína aplicada para inmovilizar (mg)

m_s : cantidad de proteína en el sobrenadante después del acoplamiento (mg)

c) Purificación de la proteína 24 del VIH-1

La purificación de la p24 del VIH-1 se llevó a cabo según Grana y col. (17). Brevemente, se realizó por cromatografía de inmunoafinidad, para lo que se utilizó el soporte AcM-Sefarosa previamente preparado.

La concentración y la pureza se estimaron de la misma forma que en el inciso a, y la actividad

biológica se confirmó mediante Western blot (13) de la p24 purificada, la cual se sometió a SDS-PAGE al 10%, en condiciones de reducción y se transfirió a membrana de nitrocelulosa, para posteriormente enfrentarse en una fase inmunológica a suero positivo al VIH-1 y al AcM anti p24.

d) Inmovilización de la p24 sobre CNBrS

Se empleó el mismo procedimiento que en el inciso b para la inmovilización de la p24 así como para la verificación de los parámetros del proceso. Al derivado inmovilizado se le denominó p24-Sefarosa.

e) Purificación de anticuerpos policlonales contra la p24

La purificación de anticuerpos policlonales contra la p24 se realizó mediante cromatografía de inmunoafinidad. El soporte empleado fue p24-Sefarosa. Se confeccionó una mezcla de sueros humanos con títulos de anticuerpos contra la p24 mayores que 1/64, por inmunodifusión radial simple y se aplicó a la columna un volumen de 6 mL cada vez. Después del lavado se realizó elución inespecífica con solución de glicina 0,1 mol/L; pH 2,8.

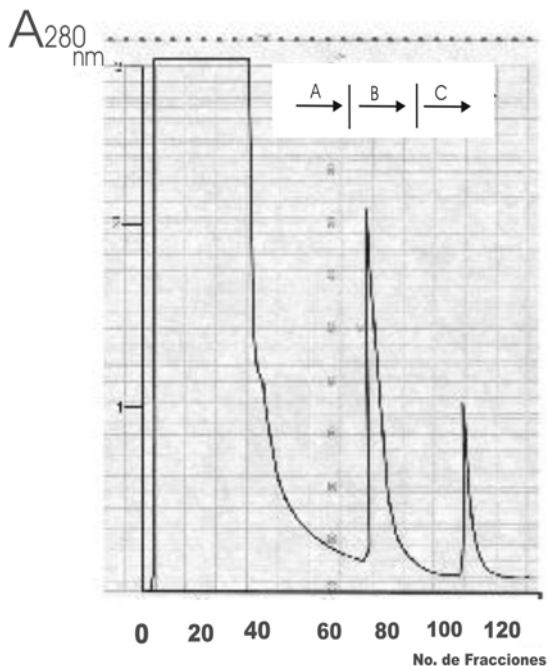
La evaluación de la especificidad y de la actividad biológica de los anticuerpos policlonales purificados se realizó por Western blot (13).

Resultados y discusión

Purificación del AcM

El cromatograma típico obtenido de la purificación del anticuerpo monoclonal se muestra en la Figura 1. El primer pico que se observa pertenece a los contaminantes presentes en la muestra, que en el líquido ascítico son albúmina y transferrina (18), proteínas que no poseen afinidad por la proteína A y por tanto no quedaron retenidas y eluyeron con la solución de equilibrio. Luego emergió un segundo pico correspondiente a los anticuerpos monoclonales, como lo reportaron Ey y col. (19) para la subclase IgG_{2b} de ratón. El tercer pico correspondió a la regeneración de la columna con la solución de regeneración ácido cítrico 0,1 mol/L pH 3.

Figura 1: Cromatograma típico de la elución del AcM anti p24 obtenido por cromatografía de afinidad utilizando Protein A Sepharose CL-4B

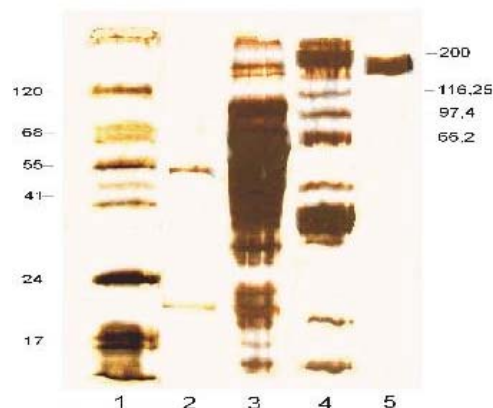


Condiciones de corrida

- SopORTE: Protein A Sepharose CL-4B
- Muestra: líquido ascítico
- Volumen del lecho: 8 mL.
- Volumen de muestra: 2 mL
- Proteínas totales: 56.28 mg/mL
- Tampón inicial: PBS pH 7,2-7,4
- Solución de elución: ácido cítrico 0,1 mol/L pH 4
- Solución de regeneración: ácido cítrico 0,1 mol/L pH 3
- Velocidad de flujo: 10 mL/h (fijación)
50 mL/h (lavados y elución)

La Figura 2 muestra los resultados de la SDS-PAGE al 10% realizada para verificar la pureza del anticuerpo monoclonal. La pureza de la preparación se determinó por evaluación visual del gel teñido con nitrato de plata. En la muestra 2 se observan bandas de 23 Kd y de 55 Kd correspondientes a las cadenas ligera y pesada de la IgG, respectivamente. En la 5 se aprecia una banda a nivel de 150 Kd correspondiente a la molécula de IgG y no se observan otras bandas en ninguna de las preparaciones (18).

Figura 2: Evaluación de la pureza del AcM purificado por cromatografía de afinidad en Protein A Sepharose CL-4B. 1) Patrón de PM (VIH-1). 2) AcM purificado (condiciones de reducción). 3) líquido ascítico. 4) Patrón de alto PM. 5) AcM purificado (condiciones de no reducción)



La selección de cromatografía de afinidad con Protein A Sepharose CL-4B, como método para la purificación del anticuerpo monoclonal contra la p24 se debió a que es el procedimiento que más se ha utilizado para la purificación de anticuerpos monoclonales del tipo IgG por sus múltiples ventajas tales como, la elevada capacidad de purificación, que no se requieren condiciones de pH muy drásticas para disociar el complejo proteína A – IgG y que se obtienen preparaciones de AcM de elevada pureza en un paso cromatográfico simple (18). De esta manera se obtuvo el AcM de manera rápida y con características adecuadas de pureza y actividad biológica, para las aplicaciones posteriores.

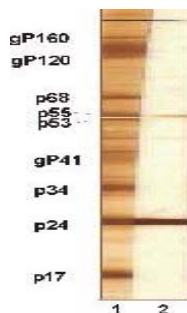
El resultado del Western blot realizado para probar la especificidad del AcM se muestra en la Figura 3. Como puede observarse, el AcM reconoció a la p24 pero tuvo una reacción, aunque más débil, con la proteína de 55 Kd (p55) del VIH-1. La p55, cuya síntesis se encuentra codificada por el gen gag, es la proteína precursora de la p24 y de las proteínas de 17 y 15 Kd del VIH-1 (p17 y p15) producto de la escisión proteolítica por una endonucleasa. Veronese y col. (19) observaron que anticuerpos monoclonales contra la p24 y la p17, fueron capaces de precipitar en un ensayo de radioinmunoprecipitación a las proteínas respectivas y que ambos también precipitaron a

una proteína común, la p55. Estos investigadores concluyeron que los mismos determinantes antigénicos reconocidos sobre los productos de la escisión, están presentes sobre la molécula p55, lo que explicaría el resultado obtenido en nuestro trabajo. En esta experiencia tampoco se observó reactividad del AcM contra las proteínas p17 y p15, lo que coincide con lo informado por estos autores.

Este experimento nos permitió comprobar la especificidad del AcM purificado, por la p24 del VIH-1 y que su actividad biológica se mantiene intacta por cuanto fue capaz de reconocer la p24 después del proceso cromatográfico a que fue sometido.

La SDS-PAGE para evaluar la pureza, unida al resultado anterior, puede considerarse como un criterio de la pureza del AcM al no verificarse en la tira de nitrocelulosa reacción alguna contra otras proteínas virales.

Figura 3: Western blot realizado al AcM anti p24 purificado. 1) Control del experimento, suero humano positivo al VIH-1. 2) AcM frente al antígeno del VIH-1



Los valores de concentración de IgG monoclonal obtenidos oscilaron alrededor de 3 mg por cada mL de líquido ascítico empleado, resultado que concuerda con lo reportado por otros autores (18).

Inmovilización del AcM anti p24

En el proceso de inmovilización de AcM anti p24 en un soporte cromatográfico, para luego purificar la p24, se obtuvo un grado de inmovilización de 7,044 mg de anticuerpo por mL de soporte y el acoplamiento tuvo un rendimiento del 92,9%.

Purificación de la p24

Los recobrados obtenidos en la purificación de la p24 fueron relativamente bajos (43,8%), lo que no impidió la utilización de esta proteína en el proceso posterior que era su inmovilización a un soporte cromatográfico, así como su utilización directamente como uno de los reactivos empleados en los estuches en cuestión. No se han encontrado reportes sobre el recobrado de p24 natural a partir de cultivos del virus, después de cromatografía de inmunoafinidad, sin embargo, en la literatura sí se ha descrito que los recobrados cuando se utilizan sistemas de expresión bacterianos son mayores (21).

Inmovilización de p24

El grado de inmovilización de p24 obtenido fue de 6,67 mg por mL de soporte y se obtuvo un 77,8% de rendimiento del acoplamiento.

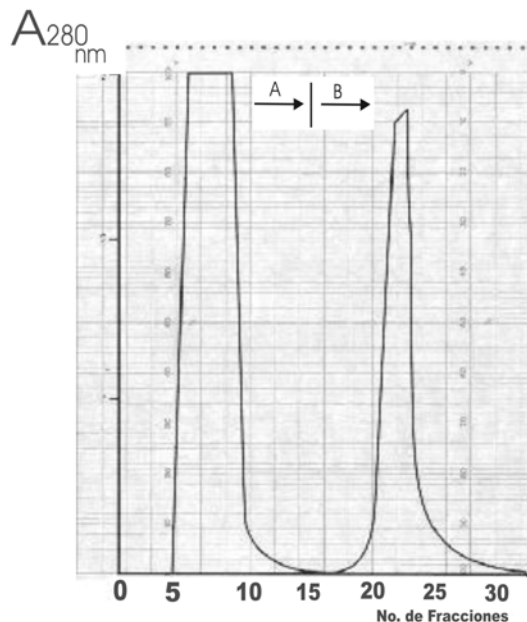
Purificación de anticuerpos policlonales contra la p24

Para la preparación del conjugado de estos estuches se requirieron anticuerpos contra la p24 y estos fueron obtenidos a partir de antisueros policlonales humanos. La selección de antisueros policlonales estuvo dada por la existencia en ellos de miles de clonotipos contra un epítopo dado, lo que significa una población heteróloga de anticuerpos con afinidades variables para las proteínas que indujeron la producción de los mismos y por tanto, mayor especificidad en los reactivos obtenidos a partir de estos sueros (22). En este sentido, los AcM tienen la desventaja de ser producidos por un clon celular secretor de anticuerpos, todos con afinidad para un mismo epítopo. Adicionalmente, basado en lo planteado por Kurstak (22) acerca de la variación de las propiedades de los sueros entre individuos de la misma especie, se determinó utilizar mezclas de sueros.

En la Figura 4 se muestra un cromatograma tipo de la purificación de estos anticuerpos a través de la columna p24-Sefarosa. El primer pico se corresponde con las proteínas que no se fijaron al soporte y el segundo, con los anticuerpos específicos contra la p24, los cuales eluyeron inespecíficamente con una solución de glicina 0,1 mol/L; pH 2,8.

El valor máximo promedio del recobrado de los anticuerpos fue de 7 mg.

Figura 4: Purificación de los Ac policlonales humanos contra la p24 a través de p24-Sefarosa

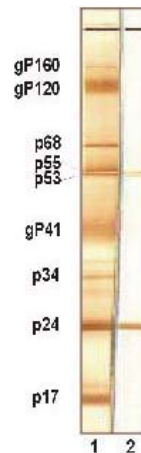


Condiciones de corrida

- Soporte: p24-Sefarosa
- Muestra: mezcla de sueros humanos positivos al VIH-1
- Volumen del lecho: 2 mL
- Volumen de muestra: 6 mL
- Tampón inicial: NaHCO₃ 0,1 mol/L pH 8,3; NaCl 0,5 mol/L
- Solución de elución: glicina 0,1 mol/L pH 2,8
- Velocidad de flujo: 10 mL/h (aplicación)
50 mL/h (lavados y elución)

En el Western blot realizado para evaluar la especificidad y la actividad biológica de las inmunoglobulinas humanas obtenidas contra la p24 se observó reactividad contra la p24 y la p55 como puede apreciarse en la Figura 5. El reconocimiento de la p55 por parte de los anticuerpos policlonales contra la p24, de la misma forma que el AcM anti p24 reconoció a dicha proteína precursora, se debe a la presencia de epitopes comunes en ambas proteínas. Este reconocimiento del Ag p24 por los anticuerpos policlonales pone de manifiesto la especificidad de los mismos y el mantenimiento de su actividad biológica.

Figura 5: Evaluación de la especificidad y de la actividad biológica de las inmunoglobulinas humanas policlonales contra la p24, realizada por Western blot.



En el presente trabajo se discutió el protocolo que se utiliza para la obtención de los reactivos biológicos que se emplean en los estuches DAVIH-Ag P24 (para la detección cualitativa y cuantitativa de Ag p24 en sobrenadantes de cultivos, suero o plasma) y DAVIH-Ac P24 (para la titulación de Ac contra la p24 en suero o plasma). Estos reactivos demostraron tener la calidad requerida para su utilización en la producción de dichos estuches, los cuales se emplean, además de para el seguimiento de las personas infectadas; en el monitoreo de los cultivos en todas las investigaciones *in vitro* y esto es importante para los estudios de los candidatos vacunales que se hacen en nuestro país y para los estudios de drogas antirretrovirales. También se utilizan en el monitoreo de la capacidad de inactivación y/o remoción viral en los procesos productivos de hemoderivados.

Referencias

1. Rubio M, Nogues A, Falguera M y Puig T. The prognostic markers of HIV infection progression. A study of the p24 in a cohort of 251 patients. *An. Med. Interna.* 1999; 16:447-50.
2. Pascale JM, Isaacs MD, Contreras P, Gómez B, Lozano L, Austin E, De Martin MC et al. Immunological markers of disease progresión in patients infected with the human

- immunodeficiency virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4:1-9.
3. Díaz HM, Ribas MA, Lubián AL, Pérez L, Izquierdo M y Silva E. Marcadores de progresión serológicos y celulares en pacientes cubanos infectados por VIH-1. *Rev. Cubana Med.* 2001; 40:10-6.
 4. Díaz HM, Silva E, Rodríguez O, Bárcena J, Lubián AL y Joanes J. Uso del ELISA DAVIH Ac P24 en el seguimiento clínico de personas infectadas por el VIH-1. *LAB-acta*; 1995; 8:15-8.
 5. Beirnaert E, Willems B and Peeters M. Design and evaluation of an in-house HIV-1 (group M and O), SIV and SIVcpz antigen capture assay. *J. Virol. Methods*; 1998; 73:65-70.
 6. Wang H, English NJ and Reid CD. Role of beta-chemokines in HIV-1 infection of dendritic cells maturing from CD34+ stem cells. *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.* 1999; 21:179-88.
 7. Saiffudin M, Hart ML and Gewurz H. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 2000; 4:949-55.
 8. Díaz HM, Ribas MA, Lubián AL, Joanes J y Ricardo ME. Antigenemia P24: correlación con algunos aspectos clínicos y epidemiológicos en 100 individuos cubanos infectados por VIH-1. *Rev. Cubana Med. Trop.* 2001; 53:137-44.
 9. Lobaina L, Noa E, Dubed M, Navea L, Vilarrubia OL y Díaz H. Isolation and virological characterization of HIV-1 in Cuba. Relationship with the clinical status of the patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 1996; 50:501-504.
 10. Noa E, Lobaina L, Dubed M, Vilarrubia OL, Díaz HM, Rodríguez O, Lubián AL et al. Aislamiento, Caracterización de las Cepas de VIH-1 y Título de Anticuerpos contra la p24 en Seropositivos con Progresión Rápida y Lenta al SIDA; *Biotecnología Aplicada*; 1997; 14:233-236.
 11. Toledo H, Baly A, Castro O, Resik S, Laferté J, Rolo F, Navea L et al. A phase I clinical trial of a multi-epitope polypeptide TAB 9 combined with Montanide ISA 720 adjuvant in non-HIV-1 infected human volunteers. *Vaccine*; 2001; 19: 4328-4336.
 12. Noa E, Menéndez de San Pedro JC, Pérez MT, Cruz O, Rubial I, González N et al. purificación de antígeno HTLV-I para Western blot. *Avances en Biotecnología Moderna. Libro de Reportes Cortos.* 1994; 2:81.
 13. Tsang VCW, Hanclock and Wilson M. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique (Western blot) for human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV/LAV) antibodies. En: *U.S. Department of Health and Human Services Immunology Series, publication no. 15.* CDC, Atlanta; 1985.
 14. Lowry OH, Rosembrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*; 1951; 193:265-69.
 15. Chávez MA, Díaz J, Pérez U y Delfín J. *Temas de Enzimología. Tomo II.* Facultad de Biología. Universidad de la Habana; 1990.
 16. Cartellieri S, Helmholz H and Niemeyer B. Preparation and Evaluation of Ricinus communis Agglutinin Affinity Adsorbents Using Polymeric Supports. *Anal. Biochem.* 2001; 295: 66-75.
 17. Grana R, Silva E, Ruiz N y Pérez MT. Purificación de la proteína de 24 Kd natural (p24) del virus de inmunodeficiencia humana tipo-1 (VIH-1) utilizando inmunoafinidad. *Rev. Cub. Med. Trop.* 1996; 48: 98-101.
 18. Gavilondo JV. Anticuerpos policlonales y monoclonales. En: *Anticuerpos monoclonales. Teoría y Práctica.* Elfos Scienceae. La Habana; 1995.
 19. Ey PL, Prowse SJ and Jenkin CR. Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using Protein A Sepharose. *Immunochemistry.* 1978; 15:429-436.
 20. Veronese FM, Copeland TD and Oroszlan S. Biochemical and Immunological analysis of Human Immunodeficiency Virus gag Gene Products p17 and p24. *J. Virol.* 1988; 62:795-801.
 21. Cheynet V, Verrier B and Mallet F. Overexpression of HIV-1 proteins in Escherichia coli by a modified expression vector and their one-step purification. *Protein Expr. Purif.* 1993; 4:367-72.
 22. Kurstak E. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. Reviews Analyses. *Bulletin of the World Health Organization* 1985; 63:793-811.

Procedures for obtaining the biological reagents for the DAVIH Ag P24 and DAVIH Ac P24 kits

Abstract

AIDS epidemic is one of the most serious problems affecting humanity today. Since science, despite all the great efforts made by scientists throughout the world, has not been able to find an effective vaccine to cure this disease, the use of anti-retroviral drugs has given the most successful results in improving life quality of AIDS patients. Hence, the importance of having the means to carry out an early diagnosis of the infection, as well as monitoring its progression with the purpose of having an influence on it. The present research work describes the obtaining of biological components required for the production of two kits used in Cuba for all HIV-AIDS related studies. To achieve this, a protocol was made that included different stages in the purification and immobilization of several molecules. Monoclonal antibody anti p24, HIV-1 p24, and polyclonal human antibodies anti p24 were obtained, with an adequate level of purity and biological activity allowing its use as intermediate products in the above mentioned stages and as reagents comprised in the kits.

Keywords: purification, monoclonal antibodies, immobilization, p24, HIV-1, polyclonal human antibodies.