SIMULACIÓN DEL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA DIABETES

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En este experimento, los estudiantes distinguirán entre los dos tipos principales de diabetes mediante el análisis de orina simulado y las pruebas ELISA.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
Placa de microtitulación	Tª ambiente
Tubos de microcentrífuga con tapón a presión (1,5 ml)	Tª ambiente
Tubos de microcentrífuga con rosca (1,5 ml)	Tª ambiente
Tubos cónicos 15 ml	Tª ambiente
Pipetas de transferencia	Tª ambiente
Pipetas de 10 ml	Tª ambiente

COMPONENTES MÓDULO II	Conservación
A Polvo de orina para análisis 1	Tª ambiente
B Polvo de orina para análisis 2	Tª ambiente
C Polvo de orina para análisis 3	Tª ambiente
D Polvo de orina diabético	Tª ambiente
E Colorante amarillo	Tª ambiente

COMPONENTES MÓDULO III	Conservación
F 10X ELISA Wash Buffer	4-8ºC
G ELISA Dilution Buffer	4-8ºC
H Antígeno Liofiilizado	4-8ºC
I Anticuerpo Primario	4-8ºC
J Anticuerpo Secundario	4-8ºC
K ABTS Liofilizado	4-8ºC
L ABTS Reaction Buffer	4-8ºC

NOTA: Tras la recepción, almacenar los componentes a las temperaturas indicadas.

NOTA: Ninguno de los componentes de este kit se ha preparado a partir de material humano.

NOTA: Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Agua destilada
- Vasos de precipitación
- Incubadora a 37ºC
- Baño de agua a 99ºC
- Pera de succión para pipetas
- Guantes de laboratorio desechables
- Gafas de protección
- **Micropipetas automáticas (100-1000 μl) y puntas. Su uso hace más fácil la práctica que utilizando las pipetas de 1 ml suministrada.**
- Agitador magnético (opcional)
- Recomendado: guantes de protección para calor
- Material de laboratorio de vidrio

NOTA: Asegúrense que el material de vidrio esté limpio, seco y libre de residuos de jabón. Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales.

3. INTRODUCCIÓN

La ***diabetes mellitus***, comúnmente llamada el "asesino silencioso", es una enfermedad crónica que conduce a niveles elevados de azúcar (glucosa) en la sangre. Se estima que el 8.3% de la población de los Estados Unidos es diabético, de los cuales 7 millones no están diagnosticados. Además, esta enfermedad afecta a millones de personas en todo el mundo, tanto jóvenes como mayores.

Los niveles de azúcar en la sangre están regulados por la **insulina**, una hormona que se sintetiza y secreta por las células beta del páncreas. La insulina madura consiste en dos cadenas proteicas distintas que están unidas por enlaces disulfuro. Sin embargo, la insulina se sintetiza inicialmente como una única cadena de proteína llamada **preproinsulina**, que consta de cuatro dominios: un péptido señal, la cadena carboxilo-terminal, la cadena B amino-terminal y el péptido C que conecta los dos terminales (Figura 1). El péptido señal en el terminal amino facilita el transporte de preproinsulina en el retículo endoplásmico para procesar la insulina. Dentro del retículo endoplásmico, las enzimas conocidas como **peptidasas señal** eliminan el péptido señal para formar lo que se llama, **proinsulina** (Figura 1A). Posteriormente, se forman enlaces disulfuro entre las cadenas A y B. La siguiente división se produce por las enzimas llamadas **endopeptidasas** que eliminan el péptido C de la proinsulina (Figura 1B), produciendo la forma madura de la insulina (Figura 1C).

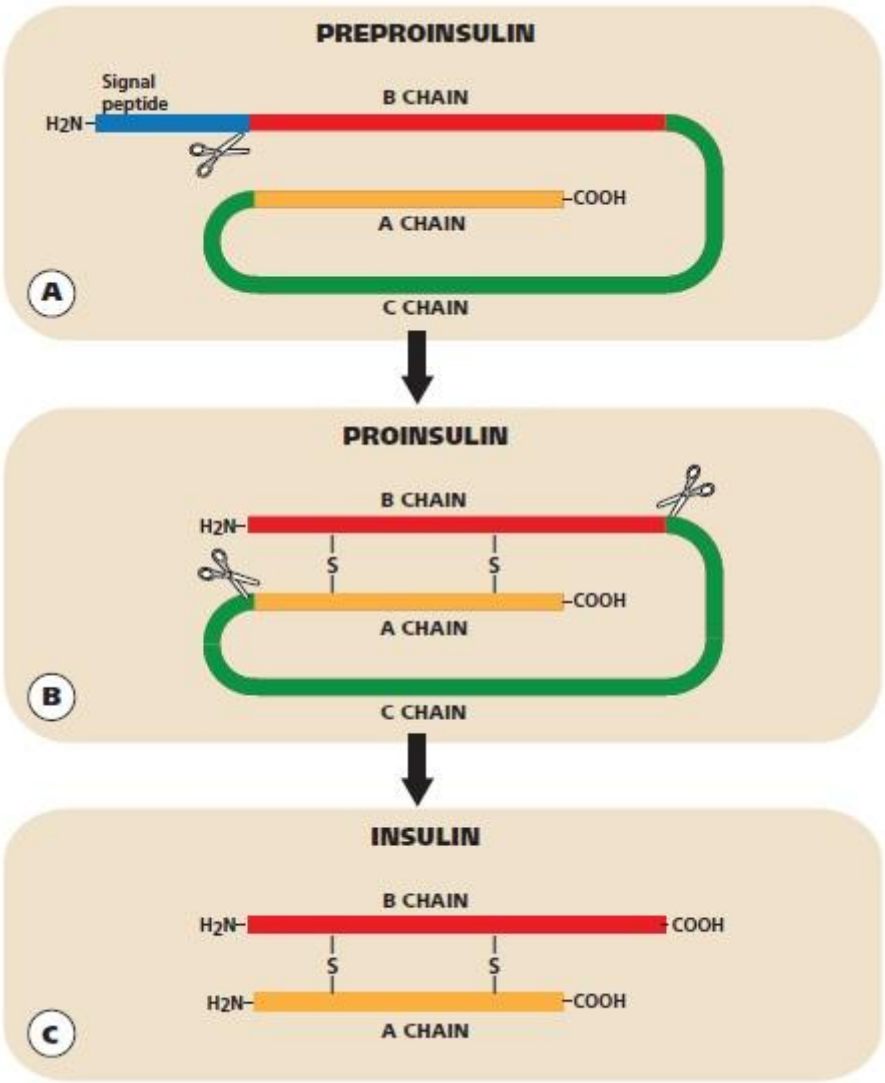


Figura 1: Proceso de maduración de la insulina

En individuos sanos, la insulina se almacena en el páncreas hasta que los niveles de glucosa en sangre comienzan a aumentar (por ejemplo, después de una comida). En este momento, la insulina se secreta (Figura 2). Una vez en el torrente sanguíneo, la insulina envía señales a las células circundantes para importar glucosa (Figura 3A). Las células descomponen inmediatamente algo de glucosa para producir energía. El exceso de glucosa generalmente se almacena en una de dos formas: **glucógeno** y **triacilgliceroles**. Los monómeros de glucosa pueden ensamblarse en una molécula de polisacárido ramificada llamada **glucógeno**, que se almacena en el hígado y en los tejidos musculares. El exceso de glucosa estimula la conversión de ácidos grasos libres a **triacilgliceroles**, que se almacenan como grasa en el tejido adiposo. Cuando los niveles de glucosa son bajos, la hormona **glucagón** estimula la liberación de la energía almacenada del hígado, los músculos y los tejidos adiposos (Figura 2).

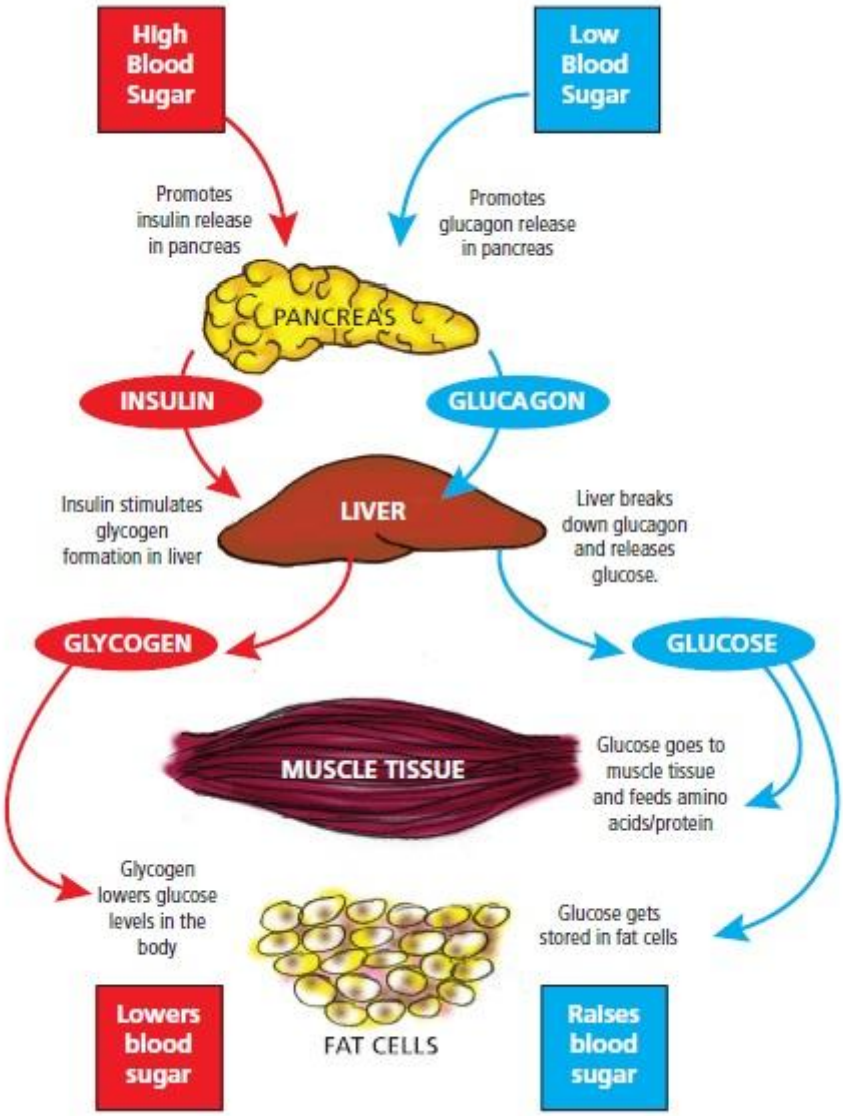


Figura 2: Homeostasis de la glucosa.

La **diabetes** ocurre cuando el cuerpo no puede regular el nivel de glucosa en la sangre. Las formas más comunes de diabetes son **diabetes tipo I** y **tipo II**. La **diabetes tipo I**, también conocida como diabetes juvenil o insulinodependiente, ocurre en la infancia y es más grave. En la diabetes tipo I, las células beta sufren destrucción autoinmune de forma progresiva y el páncreas libera poca o ninguna insulina (Figura 3B). Debido a esto, el cuerpo comienza a depender de la energía derivada de la descomposición de las grasas almacenadas en las células adiposas. Las cetonas se forman como subproductos de la grasa que se metaboliza. Un exceso de cetonas en el cuerpo produce una afección conocida como **cetoacidosis**, que puede provocar un coma diabético o incluso la muerte. Para prevenir esto, los pacientes con diabetes tipo I dependen de las inyecciones diarias de insulina para un metabolismo adecuado de la glucosa. Algunos de los síntomas de la diabetes tipo I incluyen sed excesiva (polidipsia), micción frecuente (poliuria), niveles altos de azúcar en la sangre (hiperglucemia), fatiga y pérdida de peso.

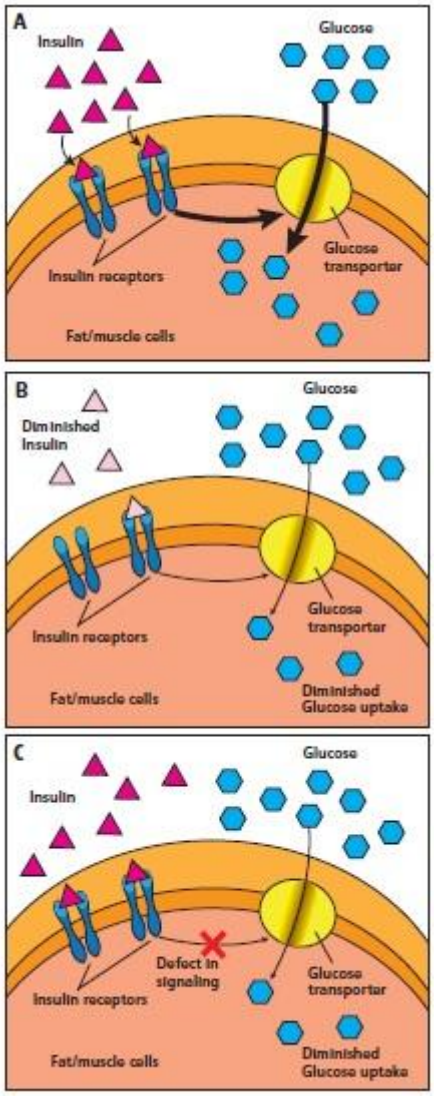


Figura 3: El efecto de los niveles de insulina en la absorción de glucosa.

La **diabetes tipo II** ocurre cuando el cuerpo se vuelve resistente a la insulina, o si el páncreas no produce suficiente insulina (Figura 3C). Los síntomas de la diabetes tipo II son similares a los del tipo I, pero a menudo no se reconocen debido a la lenta progresión de la enfermedad. Las personas afectadas por la diabetes tipo II pueden tener una predisposición genética a la diabetes, pero los factores ambientales, como un estilo de vida poco saludable, también desencadenan el desarrollo de esta enfermedad de por vida. Debido al estilo de vida sedentario y la comodidad de los restaurantes de comida rápida, muchos adultos con sobrepeso (>25 IMC) mayores de 40 años tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes tipo II. Aunque algunos pacientes con diabetes tipo II pueden regular la afección con cambios en el estilo de vida, la mayoría dependerá de las inyecciones diarias de insulina para metabolizar la glucosa.

Diagnóstico de la diabetes

Si una persona experimenta síntomas que sugieren diabetes, primero un médico determinará si el paciente tiene niveles altos de azúcar en la sangre. Los niveles de glucosa en sangre se pueden monitorear con una simple prueba de orina, ya que los altos niveles de glucosa no pueden ser reabsorbidos por el riñón. Como tal, el exceso de glucosa se excreta en la orina (**glucosuria**). La muestra de orina del paciente se analiza usando un reactivo que experimenta una conversión química en presencia de glucosa y/o cetonas, produciendo un cambio radical de color. El color final de la muestra indica el nivel de glucosa presente en la orina (Figura 4). Una persona sana tendrá un nivel de glucosa en ayunas de alrededor de 75-100 miligramos por decilitro (mg/dL). Si la prueba de orina indica un nivel elevado de azúcares y cetonas (por lo general alrededor de 125 mg/dL), se extrae sangre y se envía para un análisis posterior antes de que se realice un diagnóstico formal.

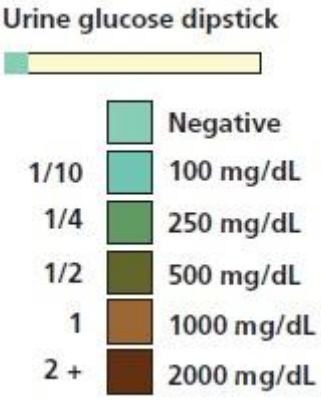


Figura 4: Ejemplo de análisis de orina para diabetes.

El **ELISA** (o Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima) usa anticuerpos para detectar la presencia de biomoléculas específicas (es decir, péptidos, proteínas, antígenos y hormonas) en una muestra compleja. Este ensayo altamente sensible puede detectar la presencia del péptido C en la muestra de sangre de un paciente. Como un paciente con diabetes tipo I no producirá insulina, el péptido C no se detecta en la muestra de sangre. Por el contrario, los pacientes con diabetes tipo II todavía producen una cantidad baja de insulina, por lo que la prueba detectará bajas cantidades del péptido C en la sangre. De esta manera, el ELISA se puede usar para diferenciar entre diabetes tipo I y tipo II.

Una de las técnicas de ELISA más sensibles es el **sándwich ELISA** (o **ensayo ELISA indirecto**), en el que se usan dos anticuerpos separados para detectar el antígeno: un anticuerpo que está unido a la placa para "capturar" el antígeno y otro que se usa para detectarlo (Figura 5).) Primero, el anticuerpo de captura se añadió a los pocillos de una placa de microtitulación de plástico transparente. El anticuerpo se adhiere de forma no específica al plástico a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Cualquier anticuerpo no unido se lava con un tampón que no reacciona. A continuación, los pocillos se "bloquean" con un tampón que contiene proteína (habitualmente caseína o albúmina de suero bovino) para evitar interacciones no específicas entre la muestra y los pocillos de plástico. Después del paso de bloqueo, las muestras de pacientes se agregan a los pocillos. El anticuerpo unido reconoce un área específica del péptido C (llamado **epítopo**) y se une de forma no covalente. Después del período de incubación, los pocillos se lavan para eliminar el exceso de muestra que no se une.

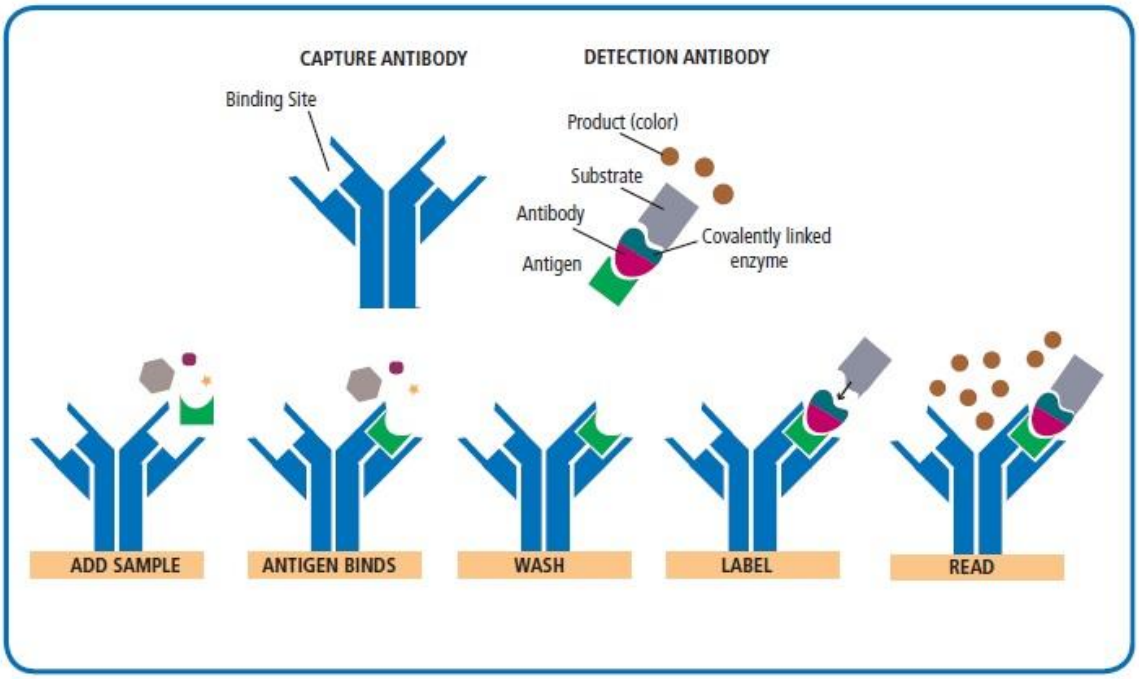


Figura 5: Diagrama de flujo de la formación del sándwich ELISA.

A continuación, se agrega el anticuerpo de detección purificado y se permite que se una al antígeno. Después de un corto período de incubación, cualquier anticuerpo no unido se elimina por lavado con tampón. El anticuerpo de detección está unido covalentemente a un enzima como la **peroxidasa de rábano picante (HRP)** que permite la detección del complejo anticuerpo-antígeno. Se agrega a cada pocillo una solución de sustrato clara e incolora que contiene peróxido de hidrógeno y ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazol-6-sulfónico) o **ABTS**. En los pocillos donde está presente el anticuerpo secundario, el HRP convertirá el peróxido de hidrógeno en $H_2O + O_2$. Esto oxida el ABTS, convirtiendo la solución de sustrato transparente en verde. El HRP tiene una alta actividad catalítica, con tasas de rotación de los sustratos superiores a 106 por segundo, lo que nos permite detectar rápidamente incluso la cantidad más pequeña de péptido C.

En esta práctica se simulan las pruebas médicas realizadas para diagnosticar la diabetes tipo I o tipo II. Después de recopilar los historiales del paciente (Módulo I), los estudiantes recibirán muestras simuladas de orina de los pacientes y usarán un reactivo químico para distinguir entre las afecciones diabéticas y las no diabéticas (Módulo II). En la parte final de la práctica (Módulo III), los estudiantes utilizarán el ELISA para detectar la presencia del péptido C en muestras de pacientes. Los datos recopilados en los tres módulos permitirán a los estudiantes diagnosticar a los pacientes como sanos, diabéticos tipo I o diabéticos tipo II.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En este experimento, los estudiantes distinguirán entre los dos tipos principales de diabetes mediante el análisis de orina simulado y las pruebas ELISA.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio durante todo el procedimiento.
2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizan calor y/o fusión de los reactivos.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA - PIPETEAR CON PERAS DE SUCCIÓN.
4. Lavarse bien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.
5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.
6. La agarosa en ebullición puede salpicar y causar quemaduras graves. Al calentar la agarosa, debe usar siempre gafas de seguridad y guantes protectores de calor.

4.2 Requisitos de tiempo (aproximado) de los procedimientos de la práctica

El horario de cada profesor y los requisitos de tiempo determinarán cuándo se deben preparar.

4.3 Preparaciones previas

Notas a los preparativos del profesor de la práctica

El tamaño de la clase, la duración de las clases de prácticas y la disponibilidad de los equipos son factores que deben ser considerados en la planificación e implementación de esta práctica con sus alumnos. Estas directrices pueden adaptarse para encajar en sus circunstancias específicas.

Registro de las actividades de laboratorio

Los científicos documentan todo lo que ocurre durante un experimento, incluyendo condiciones experimentales, pensamientos y observaciones durante la realización del experimento y, por supuesto, cualquier información recopilada. Hoy, los estudiantes documentarán su práctica en una libreta de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

Los alumnos deben registrar en su libreta de prácticas las actividades indicadas a continuación.

Antes de iniciar la práctica:

- Escribir una hipótesis que refleje la práctica.
- Predecir los resultados experimentales.

Durante la práctica:

- Registrar (dibujar) sus observaciones, o fotografiar los resultados.

Al finalizar la práctica:

- Formular una explicación de los resultados.
- Determinar lo que podría cambiar en la práctica si la repites.
- Escribir una hipótesis que refleje este cambio.

Instrucciones generales
PREPARATIVOS ANTES DE LA PRÁCTICA

A. VISIÓN GENERAL DE LOS PREPARATIVOS DE LA PRÁCTICA
En esta sección se describen las preparaciones previas recomendadas y el tiempo aproximado requerido para completar cada actividad.

Preparación para:	Qué hacer:	Cuándo:	Tiempo requerido:
Módulo I: Historial de pacientes	Fotocopiar/imprimir la tabla del historial del paciente	Antes de la clase práctica	5 minutos
Módulo II: Prueba de glucosa en orina	Preparar y alicuotar los reactivos	Durante las 24h previas a la práctica	30 minutos
Módulo III: Elisa para la detección del péptido C	Dividir la placa de microtitulación	Antes de la clase práctica	15 minutos
	Diluir 10X ELISA Wash Buffer a una soluciónn 1X	En cualquier momento antes del experimento. Conservar en nevera	5 minutos
	Alicuotar ELISA Dilution Buffer para ell control negativo y las muestras de pacientes	En cualquier momento antes del experimento. Conservar en nevera	5 minutos
	Rehidratar y alicuotar el Antigeno	Hasta una semana antes de desarrollar el experimento	10 minutos
	Rehidratar y alicuotar el Anticuerpo Primario	Hasta una semana antes de desarrollar el experimento	5 minutos
	Rehidratar y alicuotar el Anticuerpo Secundario	Hasta una semana antes de desarrollar el experimento	5 minutos
	Rehidratar y alicuotar el Substrato ABTS	Hasta una semana antes de desarrollar el experimento	5 minutos

Preparar inmediatamente antes del módulo

Preparar brevemente antes del módulo

Flexible/ Preparar hasta 1 semana antes del módulo

B. PREPARACIONES PREVIAS DEL MÓDULO I: HISTORIAL DEL PACIENTE

1. Imprimir o fotocopiar la página del historial del paciente.

2. Los estudiantes registrarán los historiales del paciente en la tabla provista o una tabla similar en el cuaderno del estudiante.

C. PREPARACIONES PREVIAS DEL MÓDULO II: PRUEBA DE GLUCOSA EN ORINA

- Preparación del reactivo de la prueba de glucosa

1. En un vaso de precipitados de 150 ml, disolver los **Componentes A** y **B** en 50 ml de agua destilada. Es aconsejable utilizar un agitador magnético para facilitar la disolución. Debe quedar una solución transparente incolora.

2. En un vaso de precipitados separado, disolver el **Componente C** en 25 ml de agua destilada. Debe quedar una solución transparente de color azul.

3. Agregar lentamente todo el volumen de la solución del **Componente C** al vaso que contiene la solución del **Componente A/B**. Mezclar bien. Debe quedar una solución transparente de color azul.

4. Dispensar 6 ml del reactivo de prueba de glucosa en tubos de 15 ml. Cada grupo de estudiantes debe recibir uno.

- Preparación de las muestras de orina simuladas

1. Etiquetar cincuenta tubos de microcentrífuga con rosca de 1,5 ml de la siguiente manera:

a. 10 tubos - Control positivo (+)
b. 10 tubos - Control negativo (-)
c. 10 tubos - Paciente 1 (P1)
d. 10 tubos - Paciente 2 (P2)
e. 10 tubos - Paciente 3 (P3)

2. En un matraz pequeño o vaso de precipitados, disolver el **Componente E** en 6 ml de agua destilada. Debe quedar una solución transparente de color amarillo.

3. Dispensar 100 µl de la solución en cada uno de los tubos de muestra de **control negativo** y **paciente 1**.

4. Disolver el **Componente D** en la solución restante. Mezclar bien. Debe quedar una solución transparente de color amarillo.

5. Dispensar 100 µl de la solución en cada uno de los tubos **control positivo, paciente 2** y **paciente 3**.

D. PREPARACIONES PREVIAS DEL MÓDULO III: PRUEBA DE ELISA

- Placas de microtitulación

1. Como se muestra en la Figura 6, orientar las placas de microtitulación de modo que los números 1-12 estén en la parte superior y las letras A-H estén a su izquierda.

2. Cortar cada placa en las líneas punteadas como se muestra en la Figura 6. Cada pieza tendrá seis pozos en un eje y uno en el otro eje. Cada grupo de laboratorio debe recibir una pieza.

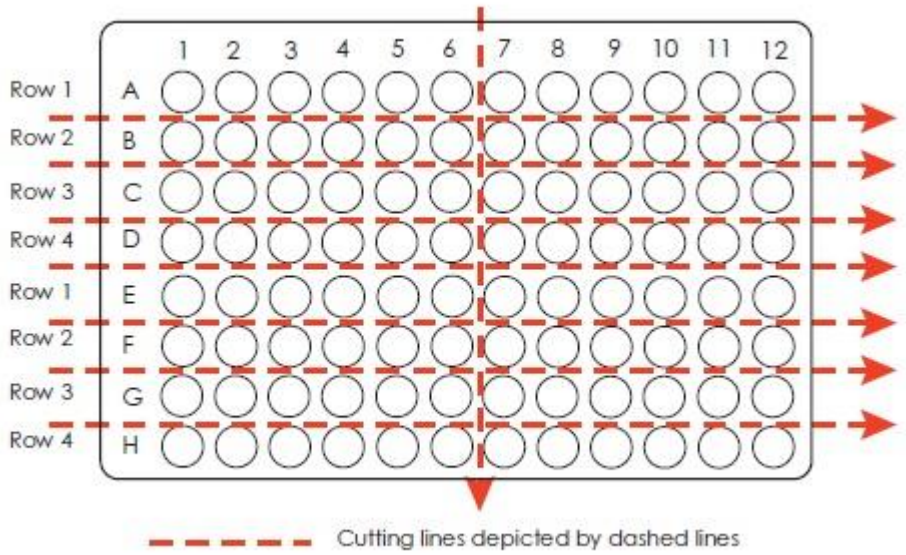


Figura 6: Placa de microtitulación.

E. PREPARACIONES PREVIAS DEL MÓDULO III: PRUEBA DE ELISA (II)

- Preparación del Tampón de Lavado

  1. Añadir todo el 10X ELISA Wash Buffer (F) a 180 ml de agua destilada y mezclar bien. Marcar como Tampón de Lavado. Dispensar 18 ml en pequeños vasos para cada grupo.

- Preparación del paciente y las muestras de control

  1. Etiquetar cincuenta tubos de microcentrífuga de 1,5 ml con tapa a presión de la siguiente manera:

     a. 10 tubos - Control positivo (+)
     b. 10 tubos - Control negativo (-)
     c. 10 tubos - Paciente 1 (P1)
     d. 10 tubos - Paciente 2 (P2)
     e. 10 tubos - Paciente 3 (P3)

  2. Distribuir 100 µl ELISA Dilution Buffer (G) como control negativo (-) y paciente 2 (P2).

  3. Transferir 7 ml de ELISA dilution Buffer a un tubo de 15 ml. Marcar como **"1º AB".**

  4. Cuidadosamente abrir el vial con el Anticuerpo Primario liofilizado (I) y transferir aproximadamente 0-5 ml del ELISA Dilution Buffer del tubo del paso 3. Cerrar y agitar suavemente el vial para mezclar.

  5. Transferir el contenido entero del Anticuerpo Primario reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclar bien.

  6. Dispensar 100 ul del Anticuerpo Primario en los microtubos control positivo (+), paciente 1 (P1) y paciente 3 (P3).

- Preparación del anticuerpo de captura
    1. Transferir 7 ml del ELISA Dilution Buffer (G) a un tubo de 15 ml. Marcar el tubo como **"Antígeno".**
    2. Cuidadosamente abrir el vial del Antígeno liofilizado (H) y transferir aproximadamente 0.5 ml del ELISA Dilution Buffer del paso 1. Cerrar y agitar suavemente el vial para mezclar.
    3. Transferir el contenido entero del Antígeno reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclar bien.
    4. Marcar 10 microtubos **"CAP"** y dispensar 650 ul en cada microtubo.
- Preparación del anticuerpo de detección
  (Debe prepararse el mismo día que sea necesario para la práctica).
    1. Transferir 7 ml del ELISA Dilution Buffer (G) a un tubo de 15 ml. Marcar el tubo como **"2ºA".**
    2. Cuidadosamente abrir el vial del Anticuerpo Secundario liofilizado (J) y transferir aproximadamente 0.5 ml del ELISA Dilution Buffer del paso 1. Cerrar y agitar suavemente el vial para mezclar.
    3. Transferir el contenido entero del Anticuerpo secundario al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclar bien.
    4. Marcar 10 microtubos **"DET"** y dispensar 650 ul en cada microtubo.
- Preparación del sustrato ABTS
    1. Transferir 10 ml del ABTS reaction Buffer (L) a un tubo de 15 ml. Marcar el tubo como **"ABTS".**
    2. Cuidadosamente abrir el vial del ABTS liofilizado (K) y transferir aproximadamente 0.5 ml del ABTS del paso 1. Cerrar y agitar suavemente el vial para mezclar.
    3. Marcar 10 microtubos **"SUB"** y dispensar 650 ul en cada microtubo.

4.4 Material que debe recibir cada grupo

Cada grupo de prácticas debe recibir los siguientes materiales antes de iniciar el procedimiento experimental:

PARA EL MÓDULO II
1 Tubo cónico (15 ml) con 6 ml de reactivos de prueba de glucosa
5 Tubos de microcentrifugación con tapón de rosca (1,5 ml) con 100 µl del control y las muestras de los pacientes (-; +; P1; P2; P3)
1 Pipeta pequeña de transferencia

PARA EL MÓDULO III
1 Placa de microtitulación de 6 pocillos
1 Vaso de precipitación con 18 ml (aproximadamente) de Tampón de Lavado
5 Microtubos con 100 µl de los controles y las muestras de pacientes (-; +; P1; P2; P3)
1 Microtubo con 650 ul del Anticuerpo de captura (CAP)
1 Microtubo con 650 ul del Anticuerpo de detección (DET) (preparado el día de la práctica)
9 Pipetas pequeñas de transferencia
1 Micropipeta y puntas automáticas (opcional)
1 Vaso vacío etiquetado como "desecho"
1 Microtubo 0con 650 ul del ABTS (SUB)

4.5 Evitar los errores más comunes

1. Seguir las instrucciones cuidadosamente.
2. Añadir las muestras a los pocillos de la placa con cuidado y precisión. Evitar llenar en exceso los pocillos.
3. No inclinar ni invertir las placas.
4. Lavar las placas suavemente, para evitar las salpicaduras.
5. Cuidado con la contaminación cruzada. Evitar reutilizar las pipetas de transferencia con soluciones diferentes. Es aconsejable el uso de micropipeta automática con puntas desechables siempre que sea posible.

5. PRÁCTICA

MÓDULO I: HISTORIAL DEL PACIENTE

REVISAR el historial del paciente ANTES de realizar el experimento.

Tres pacientes fueron examinados en el consultorio del médico y se identificaron los siguientes síntomas:

> **Paciente 1**: Varón de 50 años, peso medio, los síntomas incluyen micción excesiva. El paciente es muy activo. El último examen físico indicó presión arterial alta.
>
> **Paciente 2:** Mujer de 12 años, con bajo peso, los síntomas incluyen sed excesiva y pérdida de peso dramática. Los padres informan que el niño a menudo se queda dormido en clase.
>
> **Paciente 3:** Varón de 50 años, con sobrepeso, los síntomas incluyen micción excesiva. El paciente es sedentario. En la última revisión médica el valor de azúcar en sangre se encontraba próximo al límite superior.

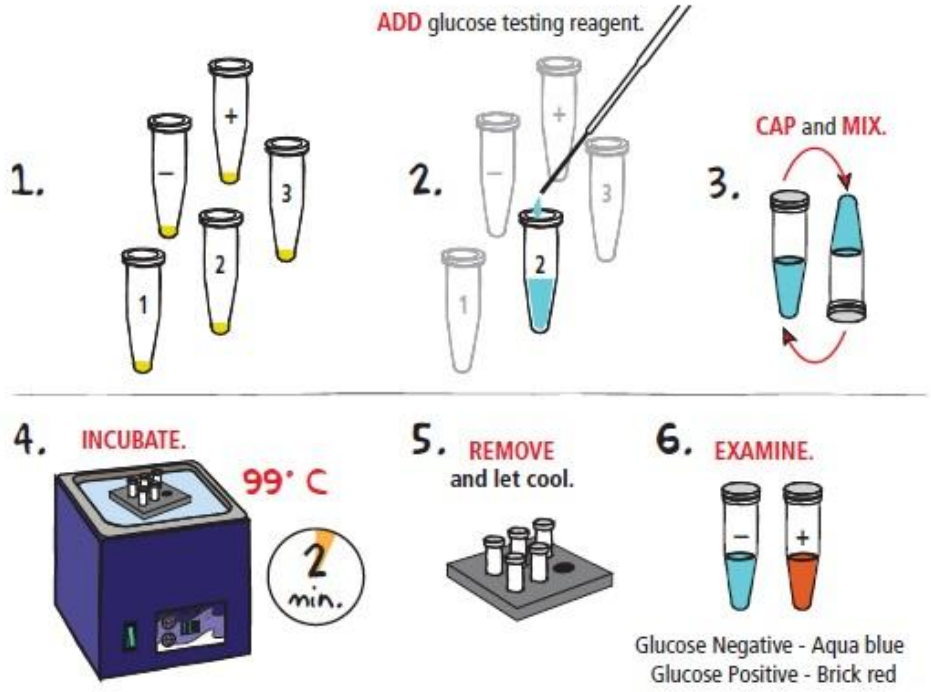
Cada paciente tiene varios síntomas, algunos que son indicativos de diabetes. Debido a estos síntomas, el médico de atención primaria ha recomendado pruebas adicionales antes de que se pueda hacer un diagnóstico. REGISTRAR cualquier síntoma que sugiera diabetes en la **Tabla 1** antes de realizar las pruebas médicas.

Muestra	Síntomas	Análisis orina	ELISA	Diagnóstico
Paciente 1				
Paciente 2				
Paciente 3				

Tabla 1

Cuando el paciente llegue para realizar más pruebas, proporcionarán una muestra de orina (Módulo II) y una muestra de sangre (Módulo III) para su análisis. En la práctica, se requiere que los pacientes ayunen durante 12 horas antes de realizar pruebas de diabetes. Esto permite al médico establecer el nivel de azúcar en sangre de referencia del paciente. Si el paciente comiera justo antes de que se realizaran las pruebas, sus niveles de azúcar en sangre serían altos debido a la respuesta del cuerpo a los alimentos. Esto enmascararía la presencia de niveles altos de azúcar en sangre.

MÓDULO II: PRUEBA DE GLUCOSA EN ORINA



1. RECOGER las muestras de los pacientes (son las muestras alicuotadas en el apartado C y que deberá entregar el profesor de prácticas). Deben estar etiquetadas de la siguiente manera:

(-) Control negativo
(+) Control positivo
(1) Paciente 1
(2) Paciente 2
(3) Paciente 3

2. AÑADIR 750 µl de reactivo de prueba de glucosa (solución con los **Componentes A/B/C**) a cada tubo.

3. CERRAR/ENROSCAR los tapones firmemente. MEZCLAR las muestras por inversión.

ATENCIÓN: Realizar los pasos 4 y 5 con mucha precaución para evitar quemaduras con el agua caliente del baño. Es aconsejable el uso de guantes de protección para el calor.

4. INCUBAR las muestras en un baño de agua a 99°C durante dos minutos.

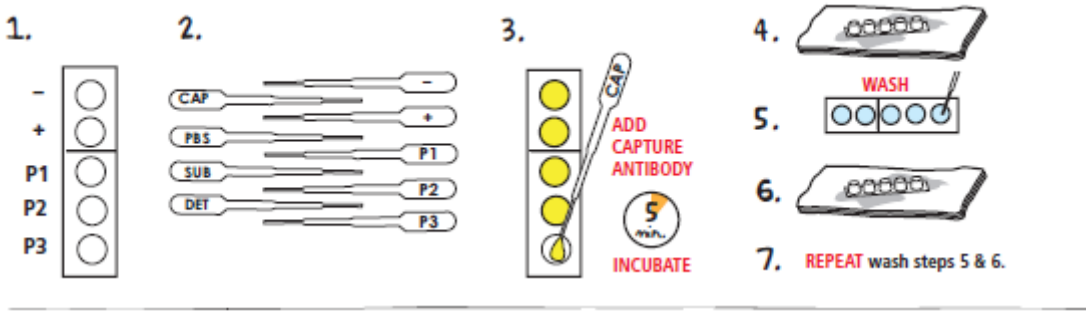
5. RETIRAR cuidadosamente las muestras del baño de agua y colocarlas en la zona de trabajo para que se enfríen.

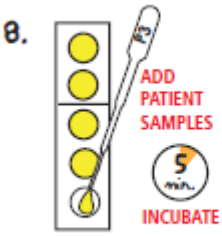
6. EXAMINAR las muestras. Las muestras negativas permanecerán azules, mientras que las muestras positivas se volverán marrón rojizas.

REGISTRAR los resultados obtenidos en la **Tabla 1** del **MÓDULO I**.

NOTA: puede aparecer un precipitado pardusco en las muestras. Mezclar bien las muestras y proceder con el análisis de datos. Esto no interferirá con los resultados.

MÓDULO III: DETECCIÓN DE PÉPTIDO C POR ELISA





Serum sample	Label	Well
Negative control	-	1
Positive control	+	2
Patient 1	P1	3
Patient 2	P2	4
Patient 3	P3	5

1. ETIQUETAR los pocillos de la placa de microtitulación como se muestra en el diagrama (-; +; P1; P2; P3).

2. ETIQUETAR las pipetas de transferencia de la siguiente manera. Estas pipetas se usarán para añadir y eliminar el líquido de los pocillos.

(-) Control negativo
(+) Control positivo
(P1) Paciente 1
(P2) Paciente 2
(P3) Paciente 3
(CAP) utilizar para añadir/eliminar el anticuerpo de captura
(PBS/WASH) utilizar para añadir el Tampón de Lavado a cada pocillo
(SUB) utilizar para añadir sustrato a cada pocillo
(DET) utilizar para añadir anticuerpos de detección a cada pocillo

ATENCIÓN: Se recomienda el uso de micropipeta automática y puntas desechables en todos los pasos de adición de soluciones para minimizar los riesgos de contaminación cruzada.

3. AÑADIR 50 µl de la solución de anticuerpo de captura (solución "**CAP**") a todos los pocillos. (Si usa pipetas de transferencia, tres gotas son aproximadamente 50 µl). **INCUBAR** la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.

4. INVERTIR la tira de la placa de microtitulación sobre el fregadero o una pila de toallas de papel para eliminar las muestras. Golpear suavemente la tira 4-5 veces sobre una toalla de papel fresca. DESECHAR las toallas de papel mojadas.

5. Con una pipeta de transferencia, AÑADIR tampón de lavado hasta llenar cada pocillo, teniendo cuidado de no llenar en exceso.

NOTA: Es importante evitar el derramar el buffer en los pocillos vecinos para minimizar la contaminación cruzada, por esta razón se recomienda manipular la placa de microtitulación lentamente y con precaución.

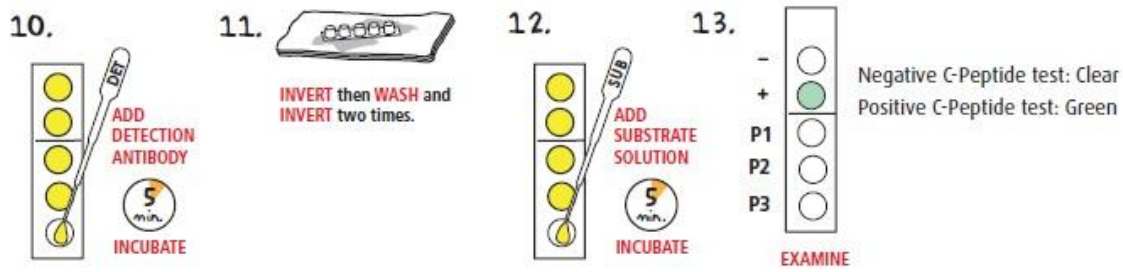
6. REPETIR el paso 4 para QUITAR el tampón de lavado.

7. Usando la misma pipeta de transferencia, REPETIR el lavado con tampón de lavado por segunda vez. INVERTIR la tira sobre toallas de papel y golpear suavemente la tira.

8. Utilizando la pipeta de transferencia debidamente etiquetada, AGREGAR 50 µL de cada una de las **muestras** del paciente al pocillo adecuado. INCUBAR la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente.

9. INVERTIR sobre toallas de papel y golpear suavemente la tira. LAVAR con solución "**PBS**" los pocillos dos veces como en los pasos 4-7.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Para el almacenamiento durante la noche, AGREGAR 200 µl de solución "**PBS**" a cada pocillo. Cubrir cuidadosamente las muestras y dejar la tira de la placa de microtitulación a temperatura ambiente. Al reanudarse la práctica, durante la siguiente clase en el laboratorio, se deberá ELIMINAR la solución "**PBS**" antes de continuar con el paso 10.



10. AÑADIR 50 µl de la solución de anticuerpo de detección (solución "**DET"**) a cada pocillo. INCUBAR la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente.

11. INVERTIR sobre toallas de papel y golpear suavemente la tira. LAVAR con tampón de lavado los pocillos dos veces como en los pasos 4-7.

12. AGREGAR 50 µl de la solución de sustrato (solución "**SUB**") a cada pocillo. INCUBAR la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente.

13. EXAMINAR los resultados obtenidos. Los resultados negativos permanecerán claras y los resultados positivos aparecerán en color verde.

14. REGISTRAR los resultados en la **Tabla 1** del **MÓDULO I**.

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

MÓDULO II: PRUEBA DE GLUCOSA EN ORINA

Muestra	Color	Interpretación
Control negativo (-)	**Azul**	Sin glucosa
Control positivo (+)	**Marrón rojizo**	Con glucosa
Paciente 1 (P1)	**Azul**	Sin glucosa
Paciente 2 (P2)	**Marrón rojizo**	Con glucosa
Paciente 3 (P3)	**Marrón rojizo**	Con glucosa

La presencia de glucosa en la orina del paciente, como lo indica el color marrón rojizo, sugiere que el paciente tiene un alto nivel de azúcar en la sangre. Se recomiendan pruebas adicionales para diagnosticar diabetes.

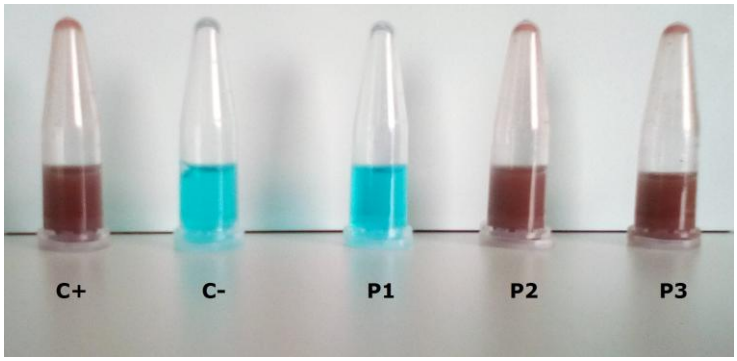


Figura 7: Prueba de glucosa en orina.

MÓDULO III: DETECCIÓN DE PÉPTIDO C POR ELISA

Muestra	Color	Interpretación
Control negativo (-)	**Transparente**	Sin péptido C
Control positivo (+)	**Verde**	Con péptido C
Paciente 1 (P1)	**Verde**	Con péptido C
Paciente 2 (P2)	**Transparente**	Sin péptido C
Paciente 3 (P3)	**Verde**	Con péptido C

La presencia del péptido C en la sangre del paciente, como lo indica el color verde, sugiere que el paciente está produciendo insulina.

Figura 8: Detección del Péptido C por ELISA.

En pacientes con alto nivel de azúcar en la sangre, la ausencia del péptido C denota diabetes tipo I, mientras que la presencia del péptido C denota diabetes tipo II.

6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

1. Comparar y contrastar la diabetes tipo I y II.
2. ¿Por qué se necesita análisis de orina y sangre para diagnosticar la diabetes?
3. ¿Por qué es importante el péptido señal? ¿Qué pasaría si la preproinsulina no tuviera el péptido señal?
4. ¿Qué es la prueba de ELISA y cómo se usa para diagnosticar la diabetes?

Se ha recopilado un historial médico de tres pacientes diferentes y realizado el análisis de orina y ELISA en las muestras de los 3 pacientes. Conociendo los resultados de las pruebas y el historial médico de los pacientes, hacer un diagnóstico para cada uno de los pacientes. (REGISTRAR el diagnóstico realizado en la **Tabla 1** del **MÓDULO I**, página 12)

6.3 Guía de soluciones de problemas

GUÍA DE SOLUCIONES PARA PROBLEMAS DEL MÓDULO II

Problema	Causa	Solución
Precipitado marrón en la prueba de glucosa en orina.	Es posible que se produzca una cierta precipitación debido a la reacción química.	Mezclar bien las muestras antes de analizar los resultados.

GUÍA DE SOLUCIONES PARA PROBLEMAS DEL MÓDULO III

Problema	Causa	Solución
Contaminación cruzada: aparece color en control negativo.	Utilizar una pipeta de transferencia incorrecta.	Tener cuidado de usar la pipeta de transferencia correcta. Usar micropipeta automática y cambiar las puntas entre muestras.
	Usar demasiada fuerza en el lavado de los pocillos (salpicaduras).	Lavar los pocillos suave y lentamente.
El color no aparece o lo hace lentamente.	Poco tiempo de incubación.	Incubar las placas durante 5 minutos más a temperatura ambiente.

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros info@bioted.es