



# 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDS (17-OH)

COD 11006 40 determinaciones
CONSERVAR A 15-30°C
Reactivos para medir la concentración de 17-hidroxicorticoesteroides Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico

## 17-HIDROXICORTICOESTEROIDES

Cromatográfica-espectrofotométrica  
PORTER-SILBER

### FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Después de un tratamiento de la orina con caolín, los esteroides se adsorben en una resina neutra. Una vez eliminadas las interferencias por lavado, se eluyen los 17-hidroxicorticoesteroides (17-OH) y se cuantifican espectrofotométricamente mediante la reacción de Porter-Silber<sup>1</sup>.

### CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- Reactivo.** 1x10 mL. Ácido sulfúrico 8 mol/L.  
*Corrosivo (C): R35: Provoca quemaduras graves. S26-37/39-45: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Usen guantes adecuados y protección para los ojos/la cara. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico.*
- Reactivo.** 1 x 90 mL. Tampón fosfatos 1 mol/L pH 6,6, azida de sodio 15 mmol/L.
- Reactivo.** 2 x 20. Contienen 0,25 g.de caolín activado.  
*Nocivo (Xn): R20/21/22: Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. S22: No respirar el polvo. S24/25: Evítese el contacto con los ojos y la piel. S36/37/39: Usen indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.*
- Microcolumnas.** 2 x 20. Contienen resina neutra equilibrada.  
**A. Reactivo.** 3 x 55 mL. Ácido sulfúrico 15 mol/L.  
*Corrosivo (C): R35: Provoca quemaduras graves. S26-30-45: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. No echar jamás agua a este producto. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico.*  
**B. Reactivo.** 2 para 55 mL. Polvo de fenilhidrazina, 6 mmol/L una vez disuelto.  
*Tóxico (T), Peligroso para el medio ambiente (N): R23/24/25-36/38-43-45-48/23/24/25-50-68: Tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. Irrita los ojos y la piel. Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel. Puede causar cáncer. Tóxico: peligro de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación, contacto con la piel e ingestión. Muy tóxico para los organismos acuáticos. Posibilidad de efectos irreversibles. S45-53-61: En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico. Evítese la exposición-recábense instrucciones especiales antes del uso. Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.*
- Patrón.** 1 x 5 mL. Cortisol 1000 mg/L = 2770 µmol/L en etanol.  
*Fácilmente Inflamable (F): R11: Fácilmente Inflamable. S7-16: Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas. No fumar.*

### CONSERVACIÓN

Conservar a 15-30°C.  
Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.  
**Indicaciones de deterioro:**  
– Reactivos: presencia de partículas, turbidez, ΔA del blanco de reactivo superior a 0,090 (cubeta de 1 cm).  
– Microcolumnas: Ausencia de tampón sobre el filtro superior.

### REACTIVOS AUXILIARES

- Etanol absoluto (grado analítico).
- Solución eluyente: diluir etanol absoluto en la proporción:  
70 mL etanol + 30 mL de agua destilada.

### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

**Reactivo de trabajo:** Golpear ligeramente un vial de Reactivo B para que el sólido quede depositado en el fondo. Destapar y verter el contenido en un frasco de Reactivo A. Tapar y agitar hasta disolución completa. Estable 4 meses a 2-8°C y al abrigo de la luz.

**Patrón de trabajo:** Diluir el Patrón (S) (1/6) en etanol (p.e. 1 mL Patrón + 5 mL etanol). Estable 2 meses a 2-8°C.

### MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o fotómetro para lecturas a 370, 410 y 450 nm.
- Baño termostabilizable.
- Centrifuga de sobremesa.

### MUESTRAS

Orina de 24 horas recogida mediante procedimientos estándar.  
Mantener a 2-8°C y utilizar antes de 24 horas. Las muestras son estables un máximo de 7 días a 2-8°C ó 1 mes a -20°C si se ajusta el pH entre 3-6 con ácido clorhídrico concentrado. Centrifugar o filtrar antes de iniciar la determinación.

### PROCEDIMIENTO

#### Tratamiento de la muestra

1. Pipetear en un Tubo de Reactivo (3):

Muestra	5,0 mL
Reactivo (1)	2 gotas

2. Agitar durante 3 minutos y centrifugar (4000 r.p.m., 5 min).
3. Transferir el sobrenadante a un tubo de centrifuga limpio y añadir:

Reactivo (2)	2,0 mL
--------------	--------

4. Agitar y centrifugar (4000 r.p.m., 5 min).

#### Separación cromatográfica

5. Destapar la Microcolumna (4), romper la lengüeta inferior y bajar el filtro superior hasta el nivel de la resina evitando comprimirla. Dejar pasar todo el sobrenadante, desechando el eluido.
6. Verter todo el sobrenadante de la centrifugación en el interior de una columna, desechando el eluido.
7. A continuación pipetear (Nota 1):

Agua destilada	10,0 mL	Desechar el eluido
Solución eluyente	6,0 mL	Recoger el eluido

## Colorimetría

8. Agitar bien el eluido y pipetear, en tubos con tapón:

	Blanco Reactivo	Patrón	Blanco Muestra	Muestra
Eluido	—	—	1,0 mL	1,0 mL
Patrón de trabajo	—	0,1 mL	—	—
Solución eluyente	1,0 mL	0,9 mL	—	—

9. Poner los tubos en un baño de hielo y añadirles lentamente y dejando resbalar por las paredes:

Reactivo (A)	—	—	1,0 mL	—
Reactivo de trabajo	1,0 mL	1,0 mL	—	1,0 mL

10. Agitar cuidadosamente, en varias veces, volviendo a introducir los tubos en el baño y evitando su calentamiento.

11. Tapar los tubos e incubarlos durante 15 minutos a 60°C ó durante 90 minutos a 37°C.

12. Enfriar hasta temperatura ambiente y leer la absorbancia (A) a 370, 410 y 450 nm, de la Muestra frente al Blanco de Muestra, y del Patrón frente al Blanco de Reactivos.

## CÁLCULOS

La concentración de 17-OH en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{\Delta A_{\text{Muestra}}}{\Delta A_{\text{Patrón}}} \times \frac{V_E}{V_M} \times \frac{V_{PC}}{V_{EC}} \times C_P \times \frac{1}{\text{Rec}} = C_{\text{Muestra}}$$

$\Delta A$  se calcula aplicando la corrección de Allen<sup>2</sup>:

$$\Delta A = 2 \times A_{410} - (A_{370} + A_{450})$$

El volumen de muestra ( $V_M$ ) es 5 mL, el volumen de eluido ( $V_E$ ) es 6 mL, el volumen de eluido en la colorimetría ( $V_{EC}$ ) es 1 mL, el volumen de Patrón en la colorimetría ( $V_{PC}$ ) es 0,1 mL, la concentración del Patrón ( $C_P$ ) es 166,7 mg/L ó 461,7  $\mu\text{mol/L}$  (el patrón se diluye 1/6) y la media de la recuperación (Rec) es 0,664. Se deducen las siguientes fórmulas para calcular la concentración:

$\frac{\Delta A_{\text{Muestra}}}{\Delta A_{\text{Patrón}}}$	x 30,1 = mg/L 17-OH
	x 83,4 = $\mu\text{mol/L}$ 17-OH

La cantidad de 17-OH en la orina de 24 horas se calcula según las siguientes fórmulas generales:

mg/L 17-OH	x $V_{\text{Orina}/24 \text{ horas}} (L) =$	mg 17-OH /24 horas
$\mu\text{mol/L}$ 17-OH		$\mu\text{mol}$ 17-OH /24 horas

## VALORES DE REFERENCIA

Mujeres: 2 - 8 mg/24h = 5,5 - 22,2  $\mu\text{mol}/24\text{h}$

Hombres: 3 - 10 mg/24h = 8,3 - 27,7  $\mu\text{mol}/24\text{h}$

Estos valores<sup>3</sup> se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de normalidad.

## CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de la Orina Control (cod. 18036 y 18037) para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

## CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Límite de detección: 1,3 mg/L = 3,4  $\mu\text{mol/L}$ .

– Límite de linealidad: 72 mg/L = 200  $\mu\text{mol/L}$ . Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra 1/2 con agua destilada y repetir la medición.

– Repetibilidad (intraserie):

Concentración media	CV	n
2,8 mg/L = 7,8 $\mu\text{mol/L}$	9,3 %	25
10,5 mg/L = 9,7 $\mu\text{mol/L}$	9,7 %	25

– Reproducibilidad (interserie):

Concentración media	CV	n
2,8 mg/L = 7,8 $\mu\text{mol/L}$	11,2 %	25
10,5 mg/L = 29,0 $\mu\text{mol/L}$	9,1 %	25

– Sensibilidad: 11,6 mA·L/mg = 4,19 mA·L/ $\mu\text{mol}$ .

– Veracidad: En la determinación de muestras cargadas con distintas concentraciones de 17-OH, los resultados no muestran diferencias sistemáticas con las concentraciones teóricas. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

– Interferencias: Algunos alimentos, medicamentos y sustancias pueden interferir<sup>4</sup>.

## CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Los 17-Hidrocorticosteroides son productos derivados del metabolismo de la hormona esteroidea cortisol que se caracterizan por tener un grupo hidroxilo en el carbono 17. Se producen en el hígado y se excretan en la orina.

La cantidad de 17-OH medido en orina es indicativa de la cantidad de cortisol liberada de la corteza adrenal a la sangre.

Se hallan valores elevados de 17-OH en el síndrome de Cushing, como resultado de un tumor adrenal, un tumor hipofisario, un tumor ectópico o bien por otras causas como la obesidad, la hipertensión y el embarazo<sup>3,5</sup>.

Valores disminuidos de 17-OH pueden deberse a la enfermedad de Addison<sup>3,5</sup>.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

## NOTAS

1. La técnica puede detenerse opcionalmente en este punto, guardando el tubo tapado a 2-8°C durante un máximo de 3 días.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ariyoshi Y, Osawa Y. Improved Assay for Urinary 17-Hydroxycorticosteroids. *Clin Chem* 1976; 22: 232-234.
2. Allen, W. M. A simple method for analyzing complicated absorption curves of use in the colorimetric determination of urinary steroids. *J. Clin. Endocrinol.* 1950; 10: 71-75.
3. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
5. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3rd ed. AACC Press, 1997.