

**FUNDAMENTO DEL MÉTODO**

Los productos del metabolismo del triptófano contenidos en la muestra, quedan retenidos por una resina neutra. La serotonina (5-HT) y el 5-hidroxitriptófano (5-HTP) se eluyen conjuntamente en primer lugar y a continuación el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Estos metabolitos se cuantifican espectrofotométricamente a través del complejo formado en la reacción con 1-nitroso-2-naftol^{1,2}.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- Reactivo. 1x500 mL. Ácido clorhídrico 0,1 mol/L.
- Reactivo. 1x200 mL. Amoníaco 20 mmol/L.
- Microcolumnas. 2x20. Contienen resina neutra equilibrada.
 - Reactivo. 1x100 mL. Ácido sulfúrico 1 mol/L.
Irritante (Xi): R36/38: Irrita los ojos y la piel. S26: En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. S45: En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico.
 - Reactivo. 1x100 mL. 1-Nitroso-2-naftol 6 mmol/L, etanol 99%.
Fácilmente Inflamable (F): R11: Fácilmente Inflamable. S7: Manténgase el recipiente bien cerrado. S16: Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas. No fumar.
 - Reactivo. 1x5 mL. Nitrato sódico 0,7 mol/L.
Nocivo (Xn), Peligroso para el medio ambiente (N): R22: Nocivo por ingestión. R51: Tóxico para los organismos acuáticos. S45: En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico. S61: Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.
 - Reactivo. 1x280 mL. Dicloroetano.
Fácilmente Inflamable (F), Tóxico (T): R11: Fácilmente Inflamable. R22: Nocivo por ingestión. R36/37/38: Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. R45: Puede causar cáncer. S45: En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico. S53: Evítese la exposición-recábense instrucciones especiales antes del uso.
- Patrón. 1x20 mL. Serotonina 46,1 mg/L equivalente a 50 mg/L = 261 µmol/L de 5-HIAA, ácido clorhídrico 0,1 mol/L, conservante. Patrón primario acuoso.

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, absorbancia del blanco de reactivo superior a 0,060 a 540 nm (cubeta de 1 cm).
- Microcolumnas (3): Ausencia de tampón sobre el filtro superior.

EQUIPO ADICIONAL

- Centrífuga de sobremesa
- Espectrofotómetro o fotómetro para lecturas a 540 nm (510-570)

MUESTRAS

Orina de 24 horas recogida mediante procedimientos estándar.

Mantener a 2-8°C y utilizar antes de 24 horas. Las muestras pueden conservarse un máximo de 15 días a 2-8°C o 1 mes a -20°C si se ajusta el pH entre 3-6 con ácido clorhídrico concentrado (HCl). Centrifugar o filtrar antes de iniciar la determinación.

PROCEDIMIENTO

Separación cromatográfica

- Destapar la Microcolumna (3), romper la lengüeta inferior y bajar el filtro hasta el nivel de la resina, evitando comprimirla. Dejar pasar todo el sobrenadante desechando el eluido.
- Añadir a la columna:

Reactivo (1)	2,0 mL	Desechar el eluido
Muestra	2,0 mL	Desechar el eluido
Reactivo (1) (Nota 1)	10,0 mL	Desechar el eluido
Reactivo (2)	1,0 mL	Desechar el eluido

- Colocar la columna sobre un tubo de centrifuga de 10 mL con tapón y pipetear:

Reactivo (2)	2,0 mL	Recoger el eluido
--------------	--------	-------------------

- Agitar bien el eluido.

Colorimetría

- Pipetear en tubos de centrifuga de 10 mL con tapón:

	Blanco	Patrón	Muestra
	—	—	Eluido
Reactivo (2)	2,0 mL	1,5 mL	—
Patrón (S)	—	0,5 mL	—
Reactivo (A)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Reactivo (B)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Reactivo (C)	1 gota	1 gota	1 gota

- Agitar bien y dejar reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente (15-30°C). Añadir a continuación a cada tubo:

Reactivo D	3,0 mL	3,0 mL	3,0 mL
------------	--------	--------	--------

- Agitar vigorosamente los tubos tapados durante 10 segundos (mixer), y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 2 minutos.
- Leer la absorbancia (A) de la fase superior del patrón y de la muestra frente a la del blanco a 540 nm (Nota 2).

CÁLCULOS

La concentración de 5-HIAA en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

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

El volumen de muestra (V_M) es 2 mL, el volumen de eluido (V_E) es 2 mL, el volumen de eluido en la colorimetría (V_{EC}) es 2 mL, el volumen de Patrón en la colorimetría (V_{PC}) es 0,5 mL, la concentración del Patrón (C_P) es de 50 mg/L ó 261 µmol/L y la media de la recuperación (Rec) es 0,87. Se deducen las siguientes fórmulas para calcular la concentración:

$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}}$	$\times 14,4 = \text{mg/L 5-HIAA}$
	$\times 75,1 = \mu\text{mol/L 5-HIAA}$

La cantidad de 5-HIAA en la orina de 24 horas se calcula según las siguientes fórmulas generales:

mg/L µmol/L	$\times V_{\text{Orina/24 horas}} (L) =$	mg/24 horas µmol/24 horas
----------------	--	------------------------------

VALORES DE REFERENCIA

Orina³: 2 - 6 mg/24 h = 10,4 - 31,2 µmol/24 h

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

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: 0,9 mg/L = 4,9 µmol/L.
- Límite de linealidad: 200 mg/L = 1050 µmol/L. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra 1/2 con agua destilada y repetir la medición.
- Repetibilidad (intra-serie):

Concentración media	CV	n
1,5 mg/L = 8,1 µmol/L	5,2 %	25
12,9 mg/L = 67,9 µmol/L	3,6 %	25

- Reproducibilidad (interserie):

Concentración media	CV	n
1,5 mg/L = 8,1 µmol/L	7,7 %	25
12,9 mg/L = 67,9 µmol/L	7,2 %	25

- Sensibilidad: 11,98 mA-L/mg = 2,29 mA-L/µmol.

Veracidad: En la determinación de muestras cargadas con distintas concentraciones de 5-HIAA, los resultados obtenidos no muestran diferencias sistemáticas con las concentraciones teóricas. Los detalles del estudio de correlación están disponibles bajo solicitud.

Interferencias: Algunos alimentos como plátanos, piña, aguacates, kiwis, ciruelas rojas, tomates, nueces y chocolate, aumentan la excreción de 5-HIAA y por ello deben eliminarse de la dieta 3-4 días antes de la recogida de la muestra. Algunos medicamentos y sustancias pueden interferir⁴.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

El ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) es un producto final del metabolismo del triptófano que se excreta en orina. Se forma como resultado de la desaminación oxidativa de la serotonina (5-hidroxitriptamina).

La serotonina, un potente estimulante del músculo liso, se produce en grandes cantidades en los tumores carcinoides, y por tanto, los pacientes con este tipo de tumores presentan altas concentraciones de 5-HIAA en orina^{3,5}.

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

Elución opcional de la serotonina: (esta determinación debe considerarse orientativa).

- Después de aplicar la muestra, pipetear en la columna:

Reactivo (1)	4,0 mL	Desechar el eluido
Reactivo (1)	6,0 mL	Recoger el eluido

La separación cromatográfica puede continuarse con la adición de Reactivo (2) para obtener el eluido de 5-HIAA.

Agitar bien el eluido (que contiene la serotonina y el 5-hidroxitriptófano), pipetear 2 mL del mismo en un tubo de centrifuga de 10 mL con tapón y realizar la colorimetría como se especifica en el procedimiento para el 5-HIAA.

Calcular la concentración de Serotonina+ 5-hidroxitriptófano según:

$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}}$	$\times 45,4 = \text{mg/L Serotonina}$
	$\times 258 = \mu\text{mol/L Serotonina}$

- Si la fase superior presenta turbidez, transferirla a un tubo de centrifuga con tapón, añadirle una punta de espátula de sulfato de sodio anhidro, agitar y dejar que se deposite o centrifugar.

BIBLIOGRAFÍA

- Udenfriend S, Titus E, Weissbach H. The identification of 5-hydroxy-3-indoleacetic acid in normal urine and a method for its assay. *J Biol Chem* 1955; 216:499-505.
- Contractor SF. A rapid quantitative method for the estimation of 5-hydroxyindoleacetic acid in human urine. *Biochem Pharm* 1966; 15:1701-1706.
- Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3rd ed. AACC Press, 1997.