

## RACCOMANDAZIONI E LINEE GUIDA

# La determinazione del 17-idrossiprogesterone

## Determination of 17-hydroxyprogesterone

Annamaria D'ALESSANDRO <sup>1</sup>, Ottavia PORZIO <sup>1, 2</sup> \* a nome del GdS-EMM

<sup>1</sup>UOC Laboratorio Analisi Cliniche, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia; <sup>2</sup>Dipartimento Medicina Sperimentale, Università di Roma "Tor Vergata", Roma, Italia

\*Autore di contatto: Ottavia Porzio, Dipartimento Medicina Sperimentale, Università di Roma "Tor Vergata", P.zza S. Onofrio 4, 00165 Roma, Italia. E-mail: [ottavia.porzio@opbg.net](mailto:ottavia.porzio@opbg.net)

### RIASSUNTO

Il 17-idrossiprogesterone (17-OHP) è uno degli steroidi intermedi della steroidogenesi surrenalica e deriva dalla conversione, a livello della zona fasciolata della corticale surrenale, sia del progesterone che del 17-idrossipregnenolone. Il 17-OHP viene poi convertito in 11-deossicortisolo mediante l'azione dell'enzima 21 $\beta$ -idrossilasi, codificata dal gene CYP21A2. In presenza di mutazioni del gene CYP21A2, si verifica una ridotta funzionalità dell'enzima, con conseguente aumento del 17-OHP che viene convertito principalmente negli ormoni deidroepiandrosterone (DEA) e androstenedione, determinando una sindrome nota come iperplasia surrenalica congenita. Concentrazioni aumentate (>240 nmol/l, >80 ng/ml) di 17-OHP in un campione di sangue prelevato in qualsiasi momento della giornata, sono diagnostiche per un deficit di 21OH: in presenza di concentrazione basali >2,0 ng/ml, è indicata la determinazione del 17-OHP dopo la stimolazione con l'ormone ACTH. La determinazione del 17-OHP nel corso degli anni ha subito delle sostanziali modifiche in ambito tecnologico al fine di rendere l'identificazione e quantificazione dell'analita più precisa, sensibile e riproducibile: ad oggi la metodica di LC-MS/MS rappresenta il *gold standard* della sua misurazione, presentando una maggiore specificità, non risentendo di interferenze da farmaci e permettendo inoltre la misurazione simultanea di numerosi ormoni steroidei. Per tale motivo si raccomanda che i risultati del 17-OHP dovrebbero essere interpretati utilizzando intervalli di riferimento appropriati non solo per età e sesso, ma correlati alla tecnologia di analisi utilizzata.

(Per citare questo articolo: D'Alessandro A, Porzio O; GdS-EMM. La determinazione del 17-idrossiprogesterone. Riv Ital Med Lab 2024 Oct 01. DOI: 10.23736/S1825-859X.24.00255-X)

### ABSTRACT

17-hydroxyprogesterone (17-OHP) is one of the intermediate steroids of adrenal steroidogenesis. In the zona fasciculata of the adrenal cortex, 17-OHP derives from the conversion of both progesterone and 17-hydroxypregnenolone. 17-OHP is then converted into 11-deoxycortisol by the action of the enzyme 21 $\beta$ -hydroxylase, encoded by the CYP21A2 gene. In the presence of mutations in the CYP21A2 gene, reduced functionality of the enzyme occurs, resulting in an increase in 17-OHP concentrations: this is converted mainly into the hormones dehydroepiandrosterone (DHEA) and androstenedione, resulting in a syndrome known as congenital adrenal hyperplasia. Increased 17-OHP concentrations >240 nmol/L (>80 ng/mL) are diagnostic of 21OH deficiency: in the presence of baseline concentrations >2.0 ng/mL, the determination of 17-OHP after stimulation with the ACTH hormone is indicated. The assay of 17-OHP over the years, has undergone substantial technological changes in order to achieve the more precise, sensitive and reproducible identification and quantification of the analyte. To date, the LC-MS/MS method represents the gold standard for its measurement, presenting greater specificity, not being affected by drug interference and also allowing the simultaneous measurement of numerous steroid hormones. For this reason, it is recommended that 17-OHP results should be interpreted using appropriate reference ranges not only for age and sex, but related to the analysis technology used. Steroid measurements may differ with the assay employed.

**Key words:** 17-alpha-hydroxyprogesterone; Congenital adrenal hyperplasia; Hyperandrogenism.

## Struttura e caratteristiche molecolari

Il 17-idrossiprogesterone (17-OHP) è uno degli steroidi intermedi nella via biosintetica surrenalica che ha come molecola iniziale il colesterolo e porta alla conversione e produzione di diversi ormoni, fino ad arrivare alla sintesi di cortisolo (steroidogenesi).

Il primo *step* della steroidogenesi surrenalica è la conversione del colesterolo a  $\Delta 5$ -pregnenolone: la reazione è catalizzata da un complesso di tre enzimi associato alla membrana interna dei mitocondri delle surrenali, denominato colesterolo desmolasi, codificato dal gene CYP11A. La reazione procede con l'idrossilazione del colesterolo catalizzata da due dei tre enzimi del complesso, rispettivamente la 20 e la 22-idrossilasi (P450<sub>sc</sub>), e porta alla formazione di 20,22R-diidrossicolesterolo. Quest'ultimo steroide viene convertito in  $\Delta 5$ -pregnenolone, con liberazione di aldeide isocaproica, ad opera della C-20,22-liasi e con l'intervento del citocromo P450. Questa reazione è comune alle vie di biosintesi di glucocorticoidi, mineralcorticoidi, androgeni, estrogeni e progesterone.

Il  $\Delta 5$ -pregnenolone così formato nei mitocondri passa nel citosol dove può essere convertito direttamente in progesterone, oppure in 17-idrossipregnenolone. A livello della zona fasciolata della corticale surrenale, sia il progesterone che il 17-idrossipregnenolone sono convertiti entrambi, attraverso reazioni enzimatiche diverse, in 17-OHP: il progesterone mediante l'enzima 17 $\alpha$ -idrossilasi, e il 17-idrossipregnenolone è utilizzato come substrato dall'enzima 3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\beta$  HSD). Il 17-OHP viene poi convertito in 11-deossicortisolo, reazione catalizzata dall'enzima 21 $\alpha$ -idrossilasi, codificata dal gene CYP21A2. L'11-deossicortisolo, infine, viene convertito a cortisolo a livello della membrana interna dei mitocondri ad opera della 11 $\beta$ -idrossilasi.<sup>1</sup>

## Funzione e significato biologico

Il 17-OHP viene prodotto principalmente nelle ghiandole surrenali e in minor misura nelle gonadi, in particolare nel corpo luteo delle ovaie.<sup>2</sup> Questo ormone è un agonista del recettore del progesterone in modo simile al progesterone, anche se più debolmente;<sup>3</sup> inoltre, è un antagonista del recettore dei mineralcorticoidi nonché un agonista parziale del recettore dei glucocorticoidi, sebbene con potenza molto bassa (50-100 volte inferiore rispetto al cortisolo). Non trattandosi infatti di un ormone nella forma attiva ed avendo una bassissima attività androgenica, esso rappresenta principalmente un precursore ormonale nella bio-

sintesi di molti altri steroidi endogeni, inclusi androgeni, estrogeni, glucocorticoidi e mineralcorticoidi.

## Utilizzo clinico del dosaggio del 17-OHP

Il 17-OHP dovrebbe essere misurato in tutte le condizioni di iperandrogenismo.<sup>4</sup> In tali condizioni cliniche si verificano una rapida crescita postnatale, un'età ossea avanzata o un pubarca prematuro nell'infanzia, nonché acne, irsutismo, alopecia, irregolarità mestruali (nelle donne) e insulinoresistenza in età adulta. In tutte queste condizioni, il dosaggio del 17-OHP trova la sua principale applicazione nella diagnosi differenziale con l'iperplasia surrenalica congenita (sindrome surrenogenitale [SAG]), costituita da un gruppo di patologie con trasmissione autosomica recessiva, causate dalla mutazione di uno specifico gene della steroidogenesi che determina la carenza dell'enzima correlato.<sup>5</sup> Circa il 90% dei casi di SAG è dovuta a mutazioni presenti nel gene CYP21A2 che codifica per la 21-idrossilasi (21OH), e determina una ridotta funzionalità dell'enzima con conseguente aumento del 17-OHP (il suo principale substrato), i cui valori sono strettamente correlati al grado di severità della deficienza enzimatica.<sup>6</sup> L'impossibilità di metabolizzare il 17-OHP determina una ipersecrezione di ACTH, con conseguente iperplasia del surrene ed aumento della produzione di androgeni, che vengono convertiti principalmente in deidroepiandrosterone (DEA) e androstenedione e quindi nei tessuti periferici in androgeni. Nelle forme più gravi, il deficit della 21OH determina inoltre una riduzione della via biosintetica del cortisolo e, nelle forme con maggiore severità, dell'aldosterone.

A seconda della gravità del deficit enzimatico, la sindrome può manifestarsi come un continuum di quadri fenotipici che vanno dalle forme Classiche più gravi ad esordio neonatale con perdita di sali e virilizzazione completa dei genitali esterni nelle femmine, ai quadri più lievi delle forme Non Classiche, con una prevalenza stimata nella popolazione caucasica di 1 su 200-1000.<sup>7</sup> Tale forma ha un esordio più tardivo e risulta caratterizzata principalmente da pubarca precoce e avanzamento dell'età ossea. Nelle donne adulte sintomatiche, l'irsutismo rappresenta il sintomo di esordio più frequente, seguito dall'oligomenorrea e dall'acne: in alcuni casi può essere presente infertilità.

Concentrazioni aumentate (>240 nmol/l, >80 ng/ml) di 17-OHP in un campione di sangue prelevato in qualsiasi momento della giornata, sono diagnostiche per un deficit di 21OH. È stato suggerito che concentrazioni di 17-OHP nelle prime ore del mattino inferiori a 2,5 nmol/l (0,82 ng/ml) nei bambini e inferiori a 6,0 nmol/l (2,0 ng/ml) ne-

gli adulti, escludano un'iperplasia surrenalica congenita.<sup>8</sup> Il bambino normale presenta, infatti, valori basali di questo ormone generalmente inferiori a 1,0 ng/ml, mentre il bambino affetto da una forma Classica del difetto mostra livelli di 17-OHP molto elevati già in condizioni basali (spesso superiori a 100 ng/ml), tali da non lasciare dubbi diagnostici. Questi *cutoff* decisionali sono stati determinati mediante tecniche radioimmunologiche, ma appaiono simili anche con le determinazioni in LC-MS/MS.<sup>9</sup>

Una concentrazione basale di 17-OHP >6 nmol/l (>2,0 ng/ml) ma <100 nmol/l (<33,0 ng/ml) è generalmente accettata per indicare una forma non Classica della malattia, anche se tale intervallo potrebbe non essere appropriato in tutte le situazioni cliniche.<sup>10</sup> In questi casi è cruciale la valutazione del 17-OHP dopo la stimolazione con l'ormone adrenocorticotropo (ACTH sintetico 250 µg e.v. o i.m.): il test prevede il posizionamento di un agocannula, l'esecuzione di un prelievo a tempo zero per 17-OHP e cortisolo, seguita dalla somministrazione di 250 µg di ACTH sintetico e successivo prelievo al tempo 60' per 17-OHP e cortisolo.

Secondo le indicazioni dell'*Endocrine Society*, concentrazioni superiori a 30 nmol/l (10 ng/ml) confermano la diagnosi di carenza di 21OH<sup>11, 12</sup> (Figura 1). Sebbene il nomogramma sia stato ottenuto mediante tecniche radioimmunologiche e non sia stato ripetuto con metodiche di LC/MS, il dato è clinicamente utilizzato per lo *screening* della forma non Classica della malattia.<sup>13</sup>

L'iperplasia surrenalica congenita viene diagnosticata

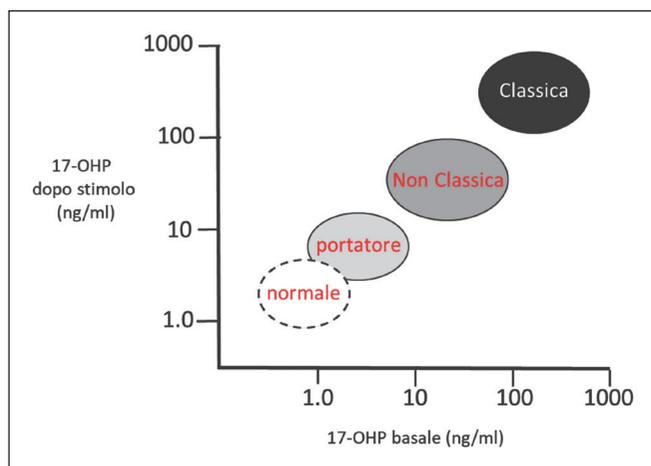


Figura 1.—La concentrazione sierica di 17-OHP, misurata in condizioni basali e 60 minuti dopo l'iniezione e.v. di un bolo standard da 250 µg di ACTH sintetico viene tracciata sul nomogramma. In questo modo, i dati di riferimento ormonali, forniscono un mezzo per genotipizzare il deficit della 21-idrossilasi nell'iperplasia surrenalica congenita (modificato da New *et al.*).<sup>12</sup>

mediante lo studio dei livelli degli ormoni steroidei. La genotipizzazione del gene CYP21A2 viene utilizzata per convalidare la diagnosi ma può fornire anche informazioni preziose per guidare il trattamento, le decisioni cliniche e la prognosi. La maggior parte dei pazienti è costituita da eterozigoti, portatori di due diverse varianti patogenetiche, dove la gravità del fenotipo è definita dall'allele che porta la variante patogenetica più lieve.<sup>12, 14</sup> La genotipizzazione è utile anche durante la consulenza genetica per la pianificazione familiare, poiché la correlazione genotipo-fenotipo consente di stabilire la gravità della malattia in un futuro nascituro. Varianti patogenetiche *de-novo* della linea germinale si verificano nell'1-2% degli alleli CYP21A2.<sup>15</sup>

Lo *screening* neonatale per la carenza della 21OH mediante il dosaggio su sangue del 17-OHP, viene effettuato in più di 40 paesi in tutto il mondo ed è obbligatorio in tutti gli stati degli Stati Uniti. In Italia ad oggi è presente soltanto in alcune Regioni che lo hanno attivato autonomamente, non essendo ancora presente un Decreto Nazionale: Abruzzo, Emilia Romagna e Lombardia.<sup>16</sup> L'obiettivo principale dei programmi di *screening* neonatale è prevenire le crisi surrenaliche e i decessi nel periodo neonatale, in particolare tra i neonati maschi, nei quali la carenza enzimatica può non essere clinicamente evidente alla nascita. I livelli di 17-OHP sono normalmente elevati alla nascita e diminuiscono rapidamente durante i primi giorni postnatali nei neonati sani mentre, al contrario, i livelli di 17-OHP aumentano con il tempo nei neonati affetti da SAG.<sup>17</sup> Bisogna però tenere presente che il neonato pretermine, malato o nato con condizioni di stress, mostra livelli più alti di 17-OHP rispetto al neonato sano a termine, potendo generare *screening* falsi positivi.<sup>18</sup> Negli ultimi dieci anni, la specificità dello *screening* è stata migliorata con lo sviluppo di test di secondo livello mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS), in grado di quantificare ulteriori metaboliti steroidei: è stato suggerito l'utilizzo del 21-desossicortisolo come potenziale ormone con indice predittivo specifico per la carenza della 21OH.<sup>19</sup>

Ulteriori valutazioni diagnostiche differenziali per escludere o comprovare altre carenze enzimatiche che possono causare elevate concentrazioni di 17-OHP (ad esempio, deficit di 11β-idrossilasi o di ossidoreduttasi P450), includono la misurazione di steroidi aggiuntivi come androstenedione, testosterone, DEA solfato, 17α-idrossipregnenolone, 11-desossicortisolo e 21-desossicortisolo e rapporti tra i precursori degli steroidi e i loro prodotti finali.<sup>5</sup> La seconda forma più comune di SAG è il

deficit di 11 $\beta$ -idrossilasi (11OHD), che determina una ridotta conversione dell'11-desossicortisolo in cortisolo. La prevalenza stimata dell'11OHD nella popolazione generale è di 1 su 100.000.<sup>20, 21</sup>

Nella 11OHD non Classica sono riportate attività enzimatiche residue che vanno dal 15% al 73%<sup>20</sup> gli ormoni steroidei secreti a monte del blocco enzimatico, come 11-desossicortisolo, progesterone, 11-desossicorticosterone e 17-OHP, aumentano e quest'ultimo viene convertito negli androgeni surrenalici dalla via androgenica surrenale inalterata. Pertanto, la forma non Classica di 11OHD potrebbe anche presentarsi con segni di iperandrogenismo come pseudopubertà precoce nei bambini o mestruazioni irregolari nelle donne, simili ai pazienti con la forma non Classica da deficit della 21OH.<sup>20</sup> I pazienti con 11OHD Classica hanno livelli elevati di 11-desossicorticosterone che possono legarsi al recettore dei mineralcorticoidi, con conseguente pressione alta, bassi livelli di renina e ipokaliemia.<sup>20, 21</sup> Poiché l'11-desossicorticosterone previene la perdita di sali, non è nota alcuna forma di 11OHD con tale sintomatologia.

Gli adenocarcinomi surrenalici, essendo nella maggior parte dei casi biochimicamente attivi con secrezione di grandi quantità di corticosteroidi e relativi metaboliti, possono determinare un aumento delle concentrazioni sieriche di 17-OHP. Poiché la secrezione di 17-OHP non risulta essere costante, il dosaggio del DEAS, dell'androstenedione e del testosterone, risultano avere una maggiore utilità clinica per la diagnosi.<sup>22, 23</sup>

## Caratteristiche pre-analitiche

### Matrice biologica

Il dosaggio del 17-OHP è determinato generalmente su campioni di siero e/o plasma. Può essere determinato inoltre sulla saliva e su DBS (*dried blood spot*, gocce di sangue essiccato) nello *screening* neonatale.

### Modalità di prelievo e variabilità biologica preanalitica

I campioni di 17-OHP devono essere prelevati al mattino poiché l'ormone segue il ritmo diurno della secrezione dell'ormone adrenocorticotropo e le sue concentrazioni sono più basse nel pomeriggio. Nelle donne, i campioni dovrebbero essere prelevati durante la fase follicolare del ciclo mestruale poiché, durante il periodo periovulatorio e la fase luteinica, le concentrazioni basali di 17-OHP sono leggermente più elevate.

Il test non dovrebbe essere richiesto in pazienti in cura con steroidi.

## Trasporto e conservazione del campione

I campioni di 17-OHP, raccolti a temperatura ambiente, devono essere centrifugati e stoccati in contenitori differenti dalle provette contenenti gel per essere conservati a 4 °C per pochi giorni o a -20 °C per diversi mesi. La limitazione all'uso di alcune provette contenenti degli specifici stabilizzanti con/e gel separatori è un'indicazione riportata sulle specifiche dei reattivi commercialmente venduti per la spettrometria di massa. In particolare il congelamento/scongelo di gel e affini può determinare l'ostruzione delle resine SPE utilizzate nella preparativa in LC-MS/MS. Tali sostanze determinano la presenza di picchi cromatografici interferenti in grado di co-eluire o creare dei segnali di disturbo nelle vicinanze dei picchi di eluizione del 17-OH progesterone. Le stesse indicazioni non sono riportate nelle Specifiche delle metodiche di determinazione del 17-OH progesterone mediante metodiche differenti (ELISA, RIA e immunometria) per quanto ogni produttore specifici in modo chiaro la tipologia di matrice biologica da utilizzare e quindi fornisca indirettamente indicazioni sull'uso della provetta più indicata per la determinazione (Tabella I).

## Caratteristiche analitiche

### L'evoluzione delle metodiche per la determinazione del 17-OH progesterone

La determinazione del 17-OHP nel corso degli anni ha subito delle sostanziali modifiche in ambito tecnologico al fine di rendere l'identificazione e quantificazione dell'anality sempre più precisa, sensibile e riproducibile.

In passato per effettuare il dosaggio del 17-OH progesterone i diversi Laboratori si sono affidati a tecniche immunochimiche in cui lo studio dell'interazione analita/anticorpo e delle proprietà dell'Anticorpo consentiva di rilevare in modo più o meno specifico la presenza dell'anality stesso nelle matrici biologiche. La prima tecnica messa a punto in tale ambito fu il dosaggio radioimmunologico (RIA) che si avvale di antigeni e/o anticorpi marcati radioattivamente. La metodica RIA (*radio immuno assay*) sfrutta l'interazione di alcuni elementi chiave per la reazione quali l'anticorpo specifico per l'antigene da determinare, il campione contenente l'antigene e l'antigene marcato radioattivamente in forma pura (marcatura con iodio-125).

Sebbene esistano diverse metodiche adottate allo scopo di separare nei saggi RIA la frazione libera dell'antigene dal complesso antigene/anticorpo (per esempio: cromatografia su colonna; precipitazione degli immunocomplessi con sali e/o solventi come il polietilenglicole, etanolo e

TABELLA I.—Informazioni disponibili per i principali kit in commercio per la determinazione del 17-OH progesterone.

Nome del produttore/metodica	Nome del prodotto	Sensibilità	Range di linearità	Matrice biologica
Abcam (ELISA)	17-OH Progesterone	LoD: 0,05 ng/ml	0,05-19,2 ng/ml	Siero e plasma (eparina/ citrato)
Demeditech diagnostic (ELISA)	17-OH Progesterone	LoD: 0,022 ng/ml	0,1-25 ng/ml	Siero e plasma (litio eparina)
Calbiotech (ELISA)	17-OH Progesterone	N/D	0-10 ng/ml	Siero
DIAMETRA (ELISA)	17-OH Progesterone	N/D	0,13-20 ng/ml	Siero e plasma (litio/ sodio eparina, EDTA)
Abnova (ELISA)	17-OH Progesterone	LoD: 0,014 ng/ml	0,1-25 ng/ml	Siero e plasma
DIAsorce (ELISA)	17-OH Progesterone	LoD: 0,03 ng/ml	0,09-15,6 ng/ml	Siero e plasma (EDTA/ eparina)
LDN (ELISA)	17-OH Progesterone	LoD: 0,02 ng/ml	0,1-25 ng/ml	Siero/plasma
DRG International (ELISA)	17-OH Progesterone	LoD: 0,013 ng/ml	0,042-20 ng/ml	Siero/plasma
CD Creative Diagnostic (ELISA)	17 alpha-hydroxy Progesterone	LoD: 15,4 pg/ml	3,6-1000 pg/ml	N/D
Astra Biotech (ELISA)	17-OH Progesterone Kit	LoD: 0,3 nmol/l	0,3-60 nmol/l	N/D
Biomnis (ELISA)	hydroxyprogesterone	N/D	N/D	Siero
Tecan (ELISA)	17-OH Progesterone	LoB: 0,03 ng/ml	0,2-20 ng/ml	Siero/plasma (EDTA)
Fortress Diagnostic (ELISA)	17-OH Progesterone	N/D	N/D	N/D
DIAsorce (RIA)	17-OHP	LoD=0,09 ng/ml LoQ=0,14 ng/ml	0,17-14 ng/ml	Siero/plasma
Demeditech diagnostic (RIA)	17-OH Progesterone	LoD: 0,07 ng/ml	0,12-50,88 ng/ml	Siero e plasma (litio eparina)
MAGLUMI (CLIA)	17-OH Progesterone	LoD=0,07 ng/ml	0,13-30 ng/ml	Siero, plasma
IDS (CLIA)	17-OH Progesterone	N/D	0,31-16,00 ng/ml	Siero, plasma (litio/sodio eparina, EDTA)
Chromsystems CE-IVD (LC-MS/MS)	Steroids Panel 1 and Panel 2	LoQ=0,06 ng/ml	/	Siero, plasma (litio/sodio eparina, EDTA)
Eureka/Sentinel Diagnostics CE-IVD (LC-MS/MS)	Ormoni steroidei sierici	LoD=0,002 ng/ml	/	Siero/plasma
Recipe CE-IVD (LC-MS/MS)	Steroids in Serum/Plasma	/	/	Siero/plasma
Waters CE/IVD (LC-MS/MS)	17-Hydroxyprogesterone	LoQ=0,25 ng/ml	0,25-100 ng/ml	Siero

ELISA: enzyme-linked immunoassay, CLIA: chemiluminescence immunoassay, RIA: radioimmunoassay. N/D: non dichiarato.

il solfato d'ammonio che rendono insolubili i complessi antigene-anticorpo; immunoprecipitazione mediante 2° anticorpo per far precipitare il complesso antigene-anticorpo da rilevare; adsorbimento non specifico dell'antigene mediante resine a scambio ionico come la silice, l'idrossiapatite e il talco; adsorbimento dell'anticorpo su fase solida; separazione mediante proteina A) la metodica RIA descritta in differenti Specifiche relative a kit in commercio per il dosaggio del 17-OH progesterone non richiede protocolli di estrazione in fase solida o liquida in virtù della specificità degli anticorpi utilizzati. Nello specifico la metodica prevede, dopo una fase d'incubazione, una fase di aspirazione per bloccare la reazione di competizione e alcune fasi di lavaggio. Al termine di questa serie di reazioni è possibile tracciare una curva di calibrazione ottenuta aggiungendo quantità note e crescenti di antigene freddo alla miscela all'equilibrio con l'antigene marcato. La concentrazione di 17-OHP viene ottenuta dall'interpolazione della curva di taratura e per sottrazione di un "bianco" che rappresenta il legame non specifico dell'isotopo radioattivo contenuto nella frazione legata. Dal momento che la radioattività costituisce una potenziale minaccia per la salute, il test ELISA ha rappresentato nel tempo un'alternativa valida e più sicura.

Il metodo ELISA ha come fine il rilevamento e l'identificazione (sia qualitativa che quantitativa) del 17-OH progesterone all'interno di un campione mediante riconoscimento dello stesso da parte di un anticorpo specifico. Uno dei grossi limiti di tale metodica risiede nella specificità anticorpale, per alcune metodiche a volte limitata, che determina delle possibili reattività crociate, l'elevata eterogeneità anticorpale e la modesta affinità di legame per l'analita.

L'incremento della specificità di legame antigene-anticorpo è correlato all'abbattimento delle sempre più ampie classi d'interferenti. L'impatto delle possibili interferenze analitiche causate da componenti endogene quali bilirubina, emoglobina, lipidi, coaguli di fibrina, anticorpi endogeni (anticorpi eterofili ovvero sia anticorpi umani diretti verso proteine animali che fattori reumatoidi e autoanticorpi, e crioglobuline) e molecole chimiche affini o esogene del sangue (farmaci) viene spesso valutato sia dai produttori di sistemi diagnostici che dagli specialisti di laboratorio, in fase di accettazione del campione o, successivamente, in caso di risultati inattesi. Alla valutazione seguono a cascata una serie di azioni correttive con l'intento, ove possibile di eliminarle, (per esempio: nuovo prelievo eseguito in condizioni migliori) o minimizzarle ma anche

This document is protected by international copyright laws. No additional reproduction is authorized. It is permitted for personal use to download and save only one file and print only one copy of this Article. It is not permitted to make additional copies (either sporadically or systematically, either printed or electronic) of the Article for any purpose. It is not permitted to distribute the electronic copy of the article through online internet and/or intranet file sharing systems, electronic mailing or any other means which may allow access to the Article. The use of all or any part of the Article for any Commercial Use is not permitted. The creation of derivative works from the Article is not permitted. It is not permitted to remove, cover, overlay, obscure, block, or change any copyright notices or terms of use which the Publisher may post on the Article. It is not permitted to frame or use framing techniques to enclose any trademark, logo, or other proprietary information of the Publisher.

e soprattutto di quantificarle per desumere la qualità del dato analitico (Tabella II).

L'ottimizzazione del metodo ha portato per anni alla valutazione dell'effetto dei numerosi parametri descritti e allo studio di alcuni parametri sperimentali d'importanza cruciale nelle reazioni immunometriche quali la scelta dell'opportuno tracciante (isotopi radioattivi, molecole fluorescenti, molecole chemiluminescenti), dell'anticorpo più idoneo e l'implementazione del metodo attraverso lo studio della curva di calibrazione prodotta. La curva di calibrazione viene a costituire la retta di regressione lineare più probabile dalla quale, per interpolazione, è desumibile la concentrazione dell'analita oggetto in studio. L'analita

stesso viene analizzato infatti secondo le stesse condizioni operative dei reagenti calibratori previa sottrazione del segnale proveniente dalle sostanze che possano influenzare la risposta strumentale (effetto matrice) in grado di costituire una fonte di errore analitico. Per minimizzare tale errore non si usa un segnale misurato ma si effettua la sottrazione del "segnale del bianco" comprendente la sola matrice. Oltre alle indicazioni circa della retta di calibrazione adottata come riferimento dalla specifica metodica sono specificati per la metodica stessa anche il LoB, LoD e LoQ (Tabella I). Il LoB (*limit of blank*) serve a fornire delle indicazioni sull'analita come proveniente da fonti esterne e serve a definire il LoD (*limit of detection*) o li-

TABELLA II.—Limitazioni da interferenze per il dosaggio del 17-OH progesterone per alcuni kit in commercio. Sono da intendersi per sostanze chimiche affini i seguenti analiti: androstenedione, testosterone, cortisolo, 11-desossicortisolo, cortisone, corticosterone, 11-deossicorticosterone, progesterone, estradiolo, estriolo, estrone, pregnenolone, prednisolone, prednisone, DEA, DHA-S, danazolo, desametasone.

Nome del produttore/metodica	Nome del prodotto	Sostanze interferenti	Specificità	Quantificazione d'interferenza
Abcam (ELISA)	17-OH Progesterone	Sostanze chimiche affini all'analita	≤0,85%	/
Demeditech diagnostic (ELISA)	17-OH Progesterone	Sostanze chimiche affini all'analita Emoglobina Bilirubina Lipemia	≤1,3%	/ >250 mg/dl >40 mg/dl >30 mg/dl
Calbiotech (ELISA)	17-OH Progesterone	/	/	/
DIAMETRA (ELISA)	17-OH Progesterone	/	/	/
Abnova (ELISA)	17-OH Progesterone	/	/	/
DIASorce (ELISA)	17-OH Progesterone	Sostanze chimiche affini all'analita Emoglobina Bilirubina Lipemia	≤4,3%	/ >500 mg/dl >100 mg/dl >250 mg/dl
LDN (ELISA)	17-OH Progesterone	/	/	/
DRG International (ELISA)	17-OH Progesterone	/	/	/
CD Creative Diagnostic (ELISA)	17 alfaidrossi progesterone	Sostanze chimiche affini all'analita	≤1,40%	/
Astra Biotech (ELISA)	17-OH Progesterone kit	/	/	/
Biomnis (ELISA)	hydroxyprogesterone	/	/	/
Tecan (ELISA)	17-OH Progesterone	Emoglobina Bilirubina Lipemia	N/D	>8,33 mg/ml >0,17 mg/ml >45,5 mg/ml
Fortress Diagnostic (ELISA)	17-OH Progesterone	/	/	/
DIASorce (RIA)	17-OHP	Sostanze chimiche affini all'analita Emoglobina Bilirubina Lipemia	≤1,07%	/ >500 >100 >1000
Demeditech diagnostic (RIA)	17-OH Progesterone	Spironolattone Anticorpi eterofili	N/D N/D	N/D N/D
MAGLUMI (CLIA)	17-OH Progesterone	Contaminazioni batteriche Anticorpi eterofili	N/D N/D	N/D N/D
IDS (CLIA)	17-OH Progesterone	/	/	/
Chromsystems CE-IVD (LC-MS/MS)	Steroids Panel 1 and Panel 2	Metilestrenolone	N/D	N/D
Eureka/Sentinel Diagnostics CE-IVD (LC-MS/MS)	Ormoni steroidei sierici	/	/	/
Recipe CE-IVD (LC-MS/MS)	Steroids in Serum/Plasma	/	/	/
Waters CE/IVD (LC-MS/MS)	17-Hydroxyprogesterone	/	/	/

ELISA: enzyme-linked immunoassay, CLIA: chemiluminescence immunoassay, RIA: radioimmunoassay. N/D: non dichiarato.

This document is protected by international copyright laws. No additional reproduction is authorized. It is permitted for personal use to download and save only one file and print only one copy of this Article. It is not permitted to make additional copies (either sporadically or systematically, either printed or electronic) of the Article for any purpose. It is not permitted to distribute the electronic copy of the article through online internet and/or intranet file sharing systems, electronic mailing or any other means which may allow access to the Article. The use of all or any part of the Article for any Commercial Use is not permitted. The production of derivative works from the Article is not permitted. It is not permitted to remove, cover, overlay, obscure, block, or change any copyright notices or terms of use which the Publisher may post on the Article. It is not permitted to frame or use framing techniques to enclose any trademark, logo, or other proprietary information of the Publisher.

mite di rivelabilità ovvero il limite inferiore di concentrazione sotto il quale il campione non può essere rivelato o quantificato con sufficiente probabilità statistica (*limit of quantification* [LoQ]).

Il metodo IUPAC consente di calcolare sia il LoD che il LoQ. Il LoD scaturisce dal contributo somma del segnale del campione del bianco e  $k$  volte lo scarto tipo del bianco. La formula che porta al calcolo del LoD è:  $LoD = x_B + kSB$  dove  $x_B$  è la concentrazione media ottenuta dalla ripetizione di almeno cinque campioni “bianchi”;  $SB$  è lo scarto tipo emerso della ripetizione dei cinque campioni “bianchi” e  $k$  è il fattore scelto in funzione del livello di confidenza. Il calcolo del LoQ è funzione del contributo della somma del segnale del campione bianco e  $k$  volte lo scarto tipo del medesimo campione per cui  $LoQ = x_B + kS$ , dove:  $x_B$  è la concentrazione media ottenuta dalla ripetizione di almeno cinque campioni “bianchi” o con concentrazioni molto piccole dell’analita oggetto di prova;  $S_B$  è lo scarto tipo emerso della ripetizione dei cinque campioni “bianchi” o con concentrazioni molto piccole dell’analita oggetto di prova e  $k$  è un fattore scelto in funzione del livello di confidenza desiderato.

Con il passare del tempo ci si è affidati sempre più a metodiche immunometriche automatizzate, specifiche, caratterizzate da basso limite di rivelazione (la rilevazione a basse concentrazioni è un limite fisico dei metodi competitivi non facilmente superabile) e alta produttività analitica garantite dalla disponibilità di dispensatori, lavatori, lettori ed elaboratori del segnale automatici. Sebbene tali metodiche siano rapide, sufficientemente precise ed accurate per test di primo livello nel Laboratorio di Biochimica Clinica, il loro punto cruciale risiede da sempre nell’affinità di legame analita/anticorpo misurato attraverso la costante di affinità o costante termodinamica di equilibrio:

$$K_{eq} = \frac{[An - Ab]_{eq}}{[Ab]_{eq}[An]_{eq}}$$

un anticorpo idoneo per lo sviluppo di metodi immunometrici ha una  $K_{eq} \leq 10^9 - 10^{12}/M$ .<sup>24</sup> Una fase preliminare importante per l’analisi qualitativa o quantitativa degli steroidi può essere l’estrazione dalla matrice biologica da esaminare con miscele parzialmente idrosolubili di solventi organici (alcol-etero, metanolo/cloroformio) che solubilizzano i lipidi e li separano dagli altri componenti. Alcune metodiche immunometriche al fine di aumentare l’affinità di legame antigene/anticorpo suggeriscono di seguire dei protocolli di preventiva estrazione degli steroidi con solventi organici per migliorare la specificità anticorpale.<sup>24, 25</sup> In alcune metodiche si raccomanda di eseguire

l’estrazione con etero prima del test di 17 OH-P (per esempio: Demeditech diagnostic - RIA).

Dal momento che l’ottimizzazione dei diversi parametri quantitativi e sperimentali, finalizzata all’incremento della specificità di legame antigene-anticorpo e all’abbattimento delle sempre più ampie classi d’interferenti è rimasto nel tempo una grossa limitazione si è passati a tecnologie più complesse e più affidabili quali la spettrometria di massa in combinazione alla cromatografia liquida ad alta prestazione (*ultra-performance liquid chromatography* [UPLC]) ovvero la LC-MS/MS. Tale tecnologia si basa sul principio secondo il quale è possibile separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica mediante l’applicazione di campi magnetici statici e/o oscillanti. Le molecole del campione sottoposte a ionizzazione ad opera di un fascio di elettroni a energia nota poiché instabili si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici, funzione della loro struttura chimica.

Gli analizzatori a triplo quadrupolo, costituiti da due singoli quadrupoli e una cella di collisione interposta, garantiscono in un unico strumento selettività, ripetibilità e la velocità del singolo quadrupolo oltre a fornire la possibilità di effettuare spettrometria di massa tandem (MS/MS). La modalità tipica di acquisizione per tali strumentazioni è la *single reaction monitoring* (SRM) o la *multi reaction monitoring* (MRM). In questa modalità i due quadrupoli lavorano in modalità SIM (*selected ion monitoring*), ovvero effettuano un monitoraggio degli ioni selezionati mentre la cella di collisione provvede alla frammentazione degli ioni precursori provenienti dal primo quadrupolo. L’analizzatore di massa a quadrupolo funziona quindi come una sorta di filtro selettivo di ioni in quanto convoglia gli ioni del campione al rivelatore sulla base del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ) trasmettendo solo il segnale relativo allo ione selezionato e consente di esplorare in sequenza l’intero campo di massa di interesse (scansione).

Nello specifico nella modalità di MRM, il primo e secondo quadrupolo vengono impostati staticamente su di uno specifico rapporto massa/carica ( $m/z$ ) in modo tale che, nel primo analizzatore (MS1) viene discriminato lo ione molecolare dell’analita e sono esclusi gli ioni con un altro rapporto  $m/z$ , mentre nel secondo analizzatore (MS2) viene rilevato lo ione frammento caratteristico ottenuto dalla frammentazione dello ione molecolare nella camera di collisione. Il vantaggio dell’uso della modalità MRM correla con una sensibilità ed una selettività di quantificazione particolarmente elevate.

Allo stato attuale la metodica di HPLC o UPLC-MS/MS fornisce specificità, precisione e limite di quantificazione ne-

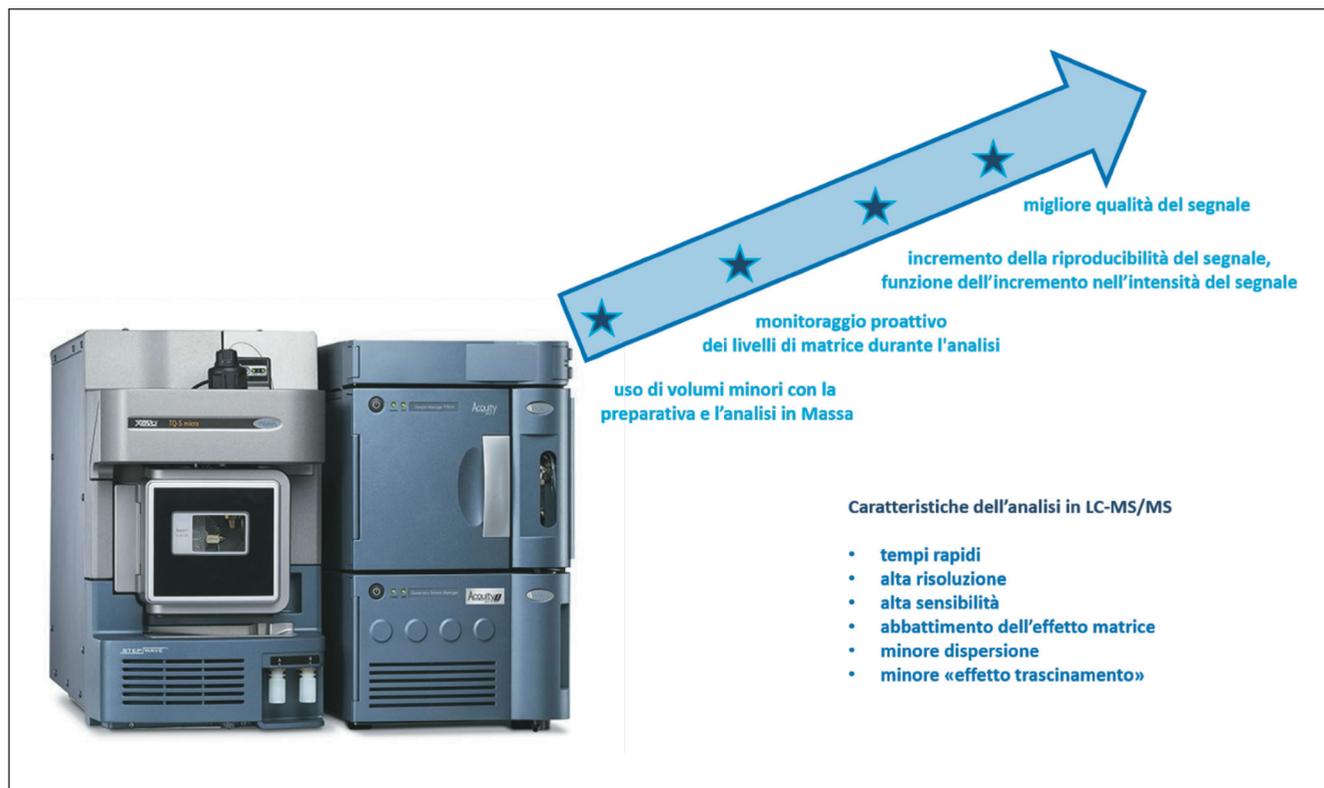


Figura 2.—Principali vantaggi della metodica LC-MS/MS.

cessari per una misura affidabile degli steroidi nei fluidi corporei, migliorando le possibilità diagnostiche, in particolare quando risulta possibile visualizzare un intero profilo steroideo per paziente. I principali vantaggi della LC-MS/MS consistono nella misurazione simultanea di molti analiti e nella maggiore specificità rispetto ai metodi immunochimici, oltre che nell'assenza di interferenze da farmaci (Figura 2).

Non è da sottovalutare inoltre come l'impatto della non sempre adeguata efficienza di dosaggio degli ormoni steroidei mediante metodiche immunometriche in alcuni campioni con interferenze, ha comportato negli ultimi anni dei costi diretti ed indiretti dovuti all'incertezza nella diagnosi e nell'approccio terapeutico. Al problema della qualità della determinazione di tali ormoni si associa il problema del limitato numero di ormoni steroidei misurabili nel laboratorio clinico mediante metodiche immunometriche e/o RIA.

### La spettrometria di massa per lo studio del pannello degli ormoni steroidei

I kit certificati CE-IVD per l'analisi del 17-idrossiprogesterone in LC-MS/MS nel siero o plasma offrono dei vantaggi a livello di sensibilità e specificità, funzione sia

di una preparativa del campione ottimizzata per una migliore estrazione degli analiti, che di una strumentazione affidabile in termini di sensibilità e robusta in termini di specificità e riproducibilità (Tabella I). La maggior parte dei kit certificati consente inoltre di effettuare la determinazione quantitativa degli ormoni che si trovano a monte e a valle del 17-OHP quali l'androstenedione, il cortisolo, il cortisone, il corticosterone, l'11-deossicorticosterone, l'11-deossicortisolo, il 21-deossicortisolo, il deidroepiandrosterone (DEA), il deidroepiandrosterone (DEAS), il diidrotestosterone (DHT), l'estradiolo, il progesterone e il testosterone (Figura 3).<sup>26, 27</sup>

In particolare, mediante protocolli di preparativa del campione per la spettrometria di massa, si effettua la determinazione sia degli steroidi liberi che legati a proteine *carrier* in campioni umani di siero o plasma. Dato che la maggior parte degli steroidi sono legati alle proteine, la preparazione del campione per la spettrometria di massa prevede l'aggiunta di una soluzione di estrazione che porta alla dissoluzione del legame proteina carrier-steroidi ed al loro rilascio. L'ulteriore vantaggio della preparativa per la massa consiste nell'estrazione in fase solida ad alta

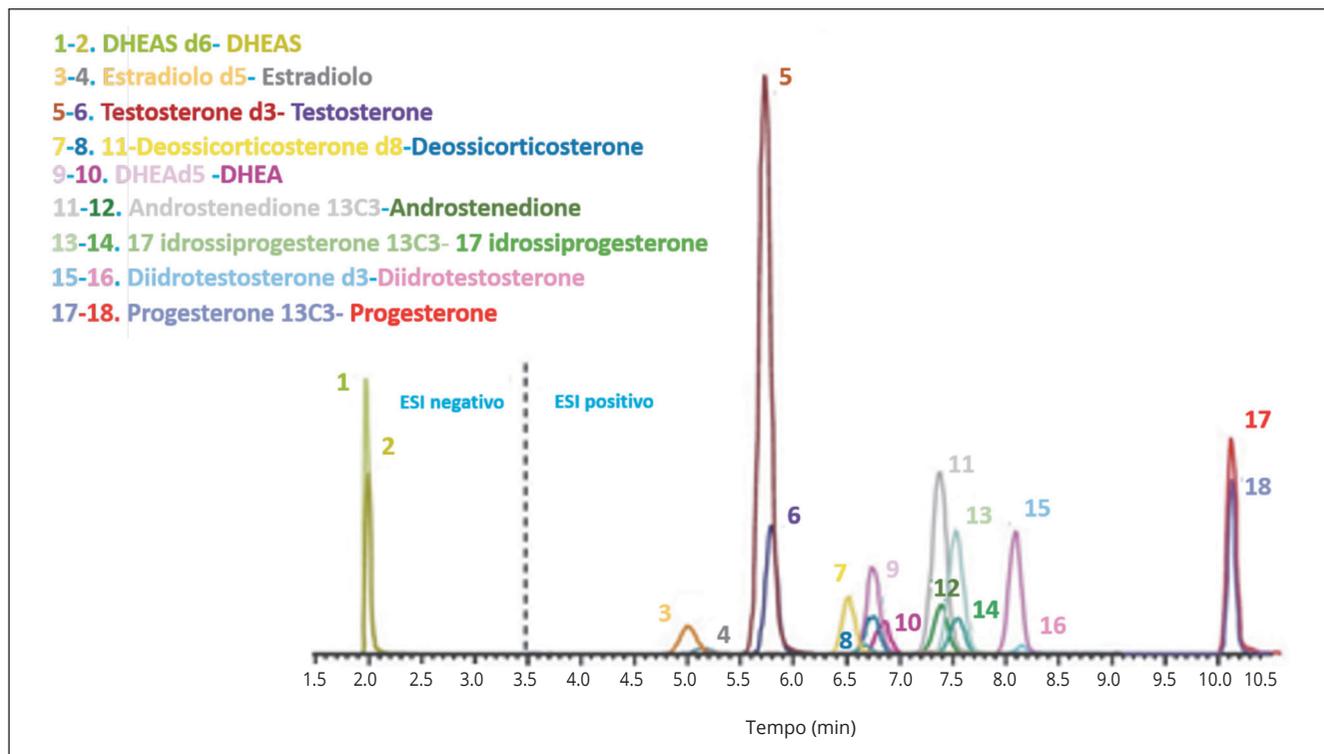


Figura 3.—Esempio di cromatogramma con la determinazione contemporanea degli ormoni steroidei.

efficienza su piastre SPE (*solid phase extraction*), nella marcatura di ogni specifico analita con uno standard interno marcato con isotopi che garantisce risultati quantitativi riproducibili e affidabili e nell'essere esenti da potenziali sostanze interferenti presenti nel siero degne di nota in grado d'influenzare i risultati quantitativi.

Per quanto concerne la strumentazione usata per la determinazione di queste molecole, su mercato vi è una vasta gamma di sistemi LC-MS/MS costituiti generalmente da un cromatografo liquido (HPLC o UPLC I-Class) in grado di consentire la realizzazione di una cromatografia liquida ad ultra-alta prestazione e a bassa dispersione, ottimizzata per trarre i massimi benefici in termini di risoluzione e sensibilità e da uno spettrometro di massa in tandem a triplo quadrupolo, rispondente alla direttiva 98/79/CE in tutte le sue parti e in grado di supportare l'uso di kit diagnostici certificati (CE-IVDR).

### Disponibilità di mercato (prodotti con marchio CE)

Nella Tabella I sono descritte le informazioni disponibili per i principali kit in commercio per la determinazione del 17-OH progesterone.

### Caratteristiche post-analitiche

#### Refertazione

Unità di misura: nmol/l, ng/ml, ng/dl. Fattore di conversione (1 nmol/l = 0,33 ng/ml).

Intervalli di riferimento: poiché il 17-OHP presenta intervalli di concentrazione diversi per sesso e fasce di età, i valori di riferimento dovrebbero essere differenziati almeno per queste caratteristiche, con una specificità nell'età neonatale poiché i livelli di 17-OHP sono normalmente elevati alla nascita e diminuiscono rapidamente durante i primi giorni postnatali.<sup>28-30</sup> Negli ultimi dieci anni, l'introduzione della LC-MS/MS ha comportato una rivalutazione dei valori di riferimento ed è pertanto consigliata l'indicazione della metodica utilizzata.

#### Armonizzazione dei risultati

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem pur essendo di immediata applicabilità nei Laboratori di Biochimica Clinica non sempre fornisce dei risultati che possano consentire di effettuare dei confronti metodica e/o strumentazione dipendenti.

L'importanza della necessità di valutare questo aspetto

è confermata dal fatto che esso rientra tra i requisiti dello standard internazionale per l'accreditamento dei laboratori medici, la norma ISO 15189:2012. Al punto 5.6.4, infatti, si declina la necessità di definire delle modalità per confrontare procedure, strumenti e metodi e di stabilire la comparabilità dei risultati ottenuti sui campioni dei pazienti lungo intervalli clinicamente appropriati.

### Raccomandazioni del GdS-EMM

- In tutte le condizioni cliniche che si manifestano con iperandrogenismo, il 17-OHP dovrebbe essere misurato per la diagnosi differenziale con l'iperplasia surrenalica congenita.

- Nei soggetti sintomatici, dopo l'infanzia, per lo *screening* della SAG si consiglia di dosare il 17-OHP su campioni di siero ottenuti prima delle 8:00 del mattino e nelle donne nella fase follicolare, utilizzando la metodica LC-MS/MS.

- In presenza di concentrazione basali di 17-OHP >2,0 ng/ml, è indicata la sua determinazione dopo la stimolazione con l'ormone ACTH (250 µg e.v. o i.m.).

- Il referto di 17OHP deve riportare l'intervallo di riferimento specifico per genere, età, metodo e/o analizzatore usato per la determinazione.

- Ogni laboratorio che misura e referta il 17-OHP deve: 1) disporre di una competenza adeguata; 2) essere disponibile a dare consulenza al clinico di riferimento e al paziente riguardo l'interpretazione del risultato refertato; 3) essere in contatto con clinici di riferimento con cui valutare collegialmente quadro clinico e quadro biochimico dei casi che lo richiedano.

### Bibliografia

1. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 2011;32:81–151.
2. Bogovich K, Richards JS. Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles: evidence that luteinizing hormone regulates thecal 17 alpha-hydroxylase and C17-20-lyase activities. *Endocrinology* 1982;111:1201–8.
3. Attardi BJ, Zeleznik A, Simhan H, Chiao JP, Mattison DR, Caritis SN; Obstetric-Fetal Pharmacology Research Unit Network. Comparison of progesterone and glucocorticoid receptor binding and stimulation of gene expression by progesterone, 17-alpha hydroxyprogesterone caproate, and related progestins. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:599.e1–7.
4. Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Ann Clin Biochem* 2014;51:424–40.
5. New MI. Inborn errors of adrenal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:75–83.
6. New MI, Speiser PW. Genetics of adrenal steroid 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 1986;7:331–49.

7. Hannah-Shmouni F, Morissette R, Sinaii N, Elman M, Prezant TR, Chen W, *et al.* Revisiting the prevalence of nonclassic congenital adrenal hyperplasia in US Ashkenazi Jews and Caucasians. *Genet Med* 2017;19:1276–9.

8. Bidet M, Bellanné-Chantelot C, Galand-Portier MB, Tardy V, Billaud L, Laborde K, *et al.* Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1570–8.

9. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, *et al.* Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:4043–88.

10. Ghizzoni L, Cappa M, Vottero A, Ubertini G, Carta D, Di Iorgi N, *et al.* Relationship of CYP21A2 genotype and serum 17-hydroxyprogesterone and cortisol levels in a large cohort of Italian children with premature pubarche. *Eur J Endocrinol* 2011;165:307–14.

11. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, *et al.*; Endocrine Society. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4133–60.

12. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, *et al.* Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:320–6.

13. Azziz R, Hincapie LA, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fox L, Boots LR. Screening for 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia among hyperandrogenic women: a prospective study. *Fertil Steril* 1999;72:915–25.

14. Merke DP, Auchus RJ. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency. *N Engl J Med* 2020;383:1248–61.

15. Concolino P, Costella A. Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-Hydroxylase Deficiency: A Comprehensive Focus on 233 Pathogenic Variants of CYP21A2 Gene. *Mol Diagn Ther* 2018;22:261–80.

16. Osservatorio Malattie Rare. Screening neonatale; 2024 [Internet]. Disponibile alla pagina: [www.osservatoriomalattie.it/news/screening-neonatale](http://www.osservatoriomalattie.it/news/screening-neonatale) [citato il 23 mag 2024].

17. Olgemöller B, Roscher AA, Liebl B, Fingerhut R. Screening for congenital adrenal hyperplasia: adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5790–4.

18. Sarafoglou K, Gaviglio A, Hietala A, Frogner G, Banks K, McCann M, *et al.* Comparison of newborn screening protocols for congenital adrenal hyperplasia in preterm infants. *J Pediatr* 2014;164:1136–40.

19. Miller WL. Congenital adrenal hyperplasia: time to replace 17OHP with 21-deoxycortisol. *Horm Res Paediatr* 2019;91:416–20.

20. White PC. Steroid 11 beta-hydroxylase deficiency and related disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:61–79, vi.

21. White PC, Speiser PW. Steroid 11 beta-hydroxylase deficiency and related disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994;23:325–39.

22. Honour JW, Price DA, Grant DB. Virilizing adrenocortical tumors in childhood. *Pediatrics* 1986;78:547.

23. Wolthers OD, Cameron FJ, Scheimberg I, Honour JW, Hindmarsh PC, Savage MO, *et al.* Androgen secreting adrenocortical tumours. *Arch Dis Child* 1999;80:46–50.

24. Tripathi V, Nara S, Chaube SK, Rangari K, Saroha A, Kariya KP, *et al.* Development of rapid and sensitive one-step direct enzyme linked immunosorbent assay for 17-alpha-OH-progesterone in serum. *J Immunoassay Immunochem* 2008;29:117–27.

25. Gonzalo-Lumbreras R, Pimentel-Trapero D, Izquierdo-Hornillos R. Solvent and solid-phase extraction of natural and synthetic anabolic steroids in human urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;754:419–25.

26. Muñoz LN, Ochetti M, Perez G, Sobrero GM, Silvano LK, Martin SE, *et al.* Measurement of serum 17α-hydroxyprogesterone in infants by radioimmunoassay. *Pediatr Endocrinol Rev* 2015;12:366–72.

27. Wheeler MJ. Immunoassay techniques. *Methods Mol Biol* 2013;1065:7–25.
28. Rauh M. Steroid measurement with LC-MS/MS. Application examples in pediatrics. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:520–7.
29. Orçun A, Yildiz Z, Köroğlu Dağdelen L. Pediatric reference intervals for Free Testosterone, 17-OH Progesterone, Androstenedione, and IGF-1 with chemiluminescence immunoassay. *Steroids* 2022;186:109078.
30. Fanelli F, Baronio F, Ortolano R, Mezzullo M, Cassio A, Pagotto U, *et al.* Normative basal values of hormones and proteins of gonadal and adrenal functions from birth to adulthood. *Sex Dev* 2018;12:50–94.

#### *Conflitti di interesse*

Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse con alcuna ditta legata al contenuto del manoscritto.

#### *Studi condotti su esseri umani e animali*

Per questo tipo di studio non è richiesto l'inserimento di alcuna dichiarazione relativa agli studi effettuati su esseri umani e animali.

#### *Consenso informato*

Per questo tipo di studio non è richiesto il consenso informato.

#### *Cronologia*

Publicato online: 1 ottobre 2024. - Accettato: 22 agosto 2024. - Ricevuto: 13 maggio 2024.