



## La diagnosi di deficit di ormone della crescita può dipendere dalle metodiche di laboratorio utilizzate?

Giada Biddeci, Barbara Rundo, Laura Losa, Sara Pagani, Kamilia Laarej,  
Anna Chiara Malvezzi, Cristina Meazza

Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

---

### *La diagnosi di deficit di ormone della crescita può dipendere dalle metodiche di laboratorio utilizzate?*

**Obiettivo:** i valori di ormone della crescita variano notevolmente in dipendenza dalle principali metodiche di dosaggio, dagli anticorpi utilizzati, dal tipo di calibratore e dall'interferenza con la proteina legante il GH. Abbiamo valutato se l'uso di differenti calibratori per la misurazione del GH con il metodo Immulite possa modificare i valori del GH ottenuti e, di conseguenza, la diagnosi di deficit di GH (GHD) nei bambini.

**Disegno dello studio:** 18 bambini di bassa statura (4 femmine e 14 maschi; età  $11.4 \pm 3.1$  anni), con le caratteristiche cliniche di soggetti con GHD (altezza:  $-2.1 \pm 0.6$  SDS; velocità di crescita:  $-2.3 \pm 1.5$  SDS; IGF-I:  $-1.2 \pm 0.9$  SDS), sono stati arruolati nello studio e sottoposti ai test di stimolo per la secrezione di GH per confermare la diagnosi di GHD.

**Metodi:** il GH e l'IGF-I sierico sono stati misurati con un metodo immunometrico chemiluminescente completamente automatico, l'Immulite 2000.

**Risultati:** la valutazione della secrezione di GH con il saggio Immulite, usando il GH umano ricombinante 98/574 come calibratore, ha rilevato una insufficiente secrezione di ormone della crescita in 15 su 18 soggetti, confermando la diagnosi clinica di GHD. Successivamente abbiamo misurato i livelli di GH negli stessi campioni usando come calibratore il GH derivato dall'ipofisi IS 80/505, trovando il deficit di GH solo in 11 soggetti.

**Conclusioni:** questi dati confermano che il valore di GH rilevato dipende dai differenti calibratori utilizzati e che questi sono quindi determinanti per la diagnosi di deficit di GH e quindi per la decisione di intraprendere una terapia sostitutiva.

### *Can growth hormone deficiency diagnosis be affected by the GH immunoassay used?*

**Objective:** growth hormone (GH) values vary among immunoassays principally due to the specificity of antibodies used, assay design, preparation of assay calibration and interference with GH binding protein. We evaluated whether the use of different calibrators for GH measurement may affect GH values and, consequently, the formulation of GH deficiency (GHD) diagnosis in children.

**Design:** 18 short children (4 females and 14 males; age  $11.4 \pm 3.1$  years), with the clinical characteristics of GHD (height:  $-2.1 \pm 0.6$  SDS; height velocity  $-2.3 \pm 1.5$  SDS; IGF-I  $-1.2 \pm 0.9$  SDS), were enrolled in this study and underwent GH stimulation tests to confirm the clinical diagnosis of GHD.

**Methods:** Serum GH and IGF-I were measured with a fully automated immunochemistry analyzer, Immulite 2000.

**Results:** the evaluation of GH secretion with the Immulite assay using the 98/574 recombinant human GH as a calibrator revealed blunted GH secretion in 15 out of 18 subjects, confirming the clinical diagnosis of GHD. Subsequently, we measured GH levels in the same samples using IS 80/505 pituitary derived GH as a calibrator, and found reduced GH levels only in 11 children.

**Conclusions:** these data confirm that GH values may depend on different calibrators used in the GH assay, and these calibrators affect the formulation of GHD diagnosis and the consequent decision to start GH substitutive treatment.

---

## **Introduzione**

Il deficit di ormone della crescita (GHD) è classicamente definito come una insufficiente secrezione di GH, che porta ad una diminuita produzione dei fattori di crescita GH-dipendenti, come gli IGFs, con una conseguente diminuzione del potenziale accrescitivo. Nella pratica clinica attuale, la diagnosi di deficit di ormone della crescita è posta in presenza di una bassa statura, una ridotta velocità di crescita, un'età scheletrica ritardata e una secrezione di GH in risposta a due stimoli farmacologici inferiore a 10 ng/ml [1]. Numerosi stimoli, che agiscono tramite differenti meccanismi, possono essere utilizzati per indurre la secrezione di GH [2]. Nonostante questo, la mancanza di riproducibilità e accuratezza dei test influenza il risultato del dosaggio della somatotropina. Inoltre, il valore di GH ottenuto in differenti laboratori di analisi, può variare in modo importante in dipendenza di vari fattori, come il tipo di saggio utilizzato, la specificità degli anticorpi, la differente matrice tra standard e campioni e l'interferenza con le proteine leganti il GH endogene (GHBPs) [3-6]. In più, pur utilizzando lo stesso metodo, i risultati ottenuti non sempre risultano confrontabili in quanto differenti standard possono essere usati per la calibrazione dello strumento. Infatti, in tutti i saggi la concentrazione del GH nel campione è letta confrontando il segnale generato dal campione con quello generato da una quantità nota di GH utilizzando curve standard (calibratore). L'eterogeneità dei risultati nel dosaggio del GH rappresenta un problema per i clinici. Infatti, la concentrazione dell'ormone della crescita ha un ruolo fondamentale nella decisione clinica di iniziare una terapia con il GH [1].

## **Scopo del lavoro**

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'influenza dei diversi calibratori, utilizzati con il metodo Immulite 2000, nella misurazione dei livelli di GH. Abbiamo analizzato i valori del picco di GH dopo test di stimolo con due differenti calibratori (IS 80/505 GH, di derivazione ipofisaria e GH 98/574, costituito da GH ricombinante da 22 kDa ed espresso in unità di massa).

## **Materiali e metodi**

### ***Pazienti***

Sono stati arruolati 18 bambini (4 femmine e 14 maschi) di bassa statura con caratteristiche cliniche di GHD, in accordo con le linee guida per il deficit di ormone della crescita, tra quelli afferenti al Centro di Ricerca di Auxologia della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Le caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nello studio sono elencate in tabella 1. Ogni soggetto è stato sottoposto

alla valutazione della secrezione di GH dopo due stimoli farmacologici (arginina e glucagone) per confermare la diagnosi clinica. Sono state escluse altre patologie quali diabete insipido, anomalie cromosomiche, sindromi dismorfiche, malassorbimenti come celiachia, altre malattie croniche o GHD acquisito. Tutti i soggetti hanno mostrato una normale funzionalità tiroidea e surrenalica. La RMN della regione ipotalo-ipofisaria è risultata nella norma in tutti i pazienti. L'altezza è stata misurata da pediatri esperti con lo stadiometro di Harpenden ed espressa in termini di deviazione standard (SDS) per l'età cronologica, secondo gli standards di Tanner [7]. L'età ossea è stata stimata secondo Greulich e Pyle.

### **Metodi**

La concentrazione sierica di GH e IGF-I è stata valutata nel Laboratorio di Analisi Chimiche della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia con un analizzatore completamente automatico, Immulite 2000, prodotto dalla Siemens. Il metodo per il dosaggio del GH e dell'IGF-I è un metodo immunometrico chemiluminescente in fase solida. In particolare, la concentrazione sierica di GH è stata valutata con due differenti calibratori, IS 80/505 e GH 98/574.

IS 80/505 è di origine pituitaria ed è costituito da un mix di isoforme di GH (20 e 22 kDa, dimeri e oligomeri), sebbene la isoforma da 22 kDa sia quella più rappresentata. Questo calibratore è stato usato fino all'introduzione del nuovo GH 98/574, costituito da una forma ricombinante di 22 kDa, puro al 95% e che permette una calibrazione del saggio in termini di unità massa.

### **Metodi statistici**

I dati sono riportati come media e deviazione standard. L'analisi statistica è stata eseguita con il *software* statistico Medcalc (Medcalc, Mariakerke, Belgio). Per l'analisi statistica dei dati appaiati è stato utilizzato il t-test; il test era a due code ed è stato considerato statisticamente significativo un valore di  $p < 0.05$ .

## **Risultati**

Abbiamo valutato i livelli di GH dopo stimolazione farmacologica nei pazienti arruolati. Inizialmente, per il dosaggio del GH abbiamo utilizzato il nuovo calibratore 98/574 ricombinante e abbiamo osservato una ridotta secrezione di GH in 15 su 18 pazienti ( $< 10$  ng/ml), confermando la diagnosi clinica di GHD; tre bambini hanno mostrato normali livelli sierici di ormone della crescita (16.3 ng/ml, 13.4 ng/ml e 14.4 ng/ml). Dopodiché, abbiamo misurato i livelli di GH negli stessi campioni dei pazienti usando IS 80/505 come calibratore. Come mostrato nella figura 1, con quest'ultimo calibratore il picco di GH è risultato normale in altri 4 bambini (12.8 ng/ml, 11.3 ng/ml, 11.3 ng/ml e 11.5 ng/ml), oltre ai precedenti, permettendo la diagnosi di nanismo ipofisario solo in 11 bambini su 18.

## **Discussione**

Il dosaggio dell'ormone della crescita è fondamentale per la diagnosi di deficit di GH nei bambini. Nonostante ciò, molti fattori possono influenzare la misurazione del GH producendo risultati discrepanti tra differenti laboratori. Questi dati sono di fondamentale importanza per decidere se iniziare la terapia o meno, pertanto una standardizzazione nel dosaggio dell'ormone della crescita risulta necessaria. Durante gli anni sono stati investigati anche altri *markers* di attività del GH, come IGF-I e IGFBP-3, per migliorare l'affidabilità e la riproducibilità del test di dosaggio dell'ormone della crescita. Seb-

bene alcuni studi abbiano mostrato l'utilità del dosaggio di IGF-I e IGFBP3 nella diagnosi di GHD, esistono dati discordanti; per questo motivo i suddetti parametri al momento non vengono utilizzati in sostituzione dei test di stimolo per la diagnosi di deficit di GH [8-10].

In questo studio abbiamo valutato l'impatto di differenti calibratori sui valori ottenuti dal dosaggio dell'ormone della crescita, dimostrando che ciò può condurre a risultati diversi con importanti implicazioni cliniche. Infatti, i dati ottenuti hanno confermato che il calibratore 98/574 fornisce valori più bassi di GH rispetto a quello di derivazione ipofisaria, confermando gli studi di Carrozza ed altri [11]. Usando il GH ricombinante come calibratore e un *cut-off* di normalità del GH di 10 ng/ml, è stato possibile fare diagnosi di nanismo ipofisario in 15 su 18 soggetti, mentre con il secondo calibratore sono stati identificati solo 11 soggetti con deficit di GH. Questo *cut-off* è stato validato negli anni '60-'70, usando anticorpi policlonali e un metodo radioimmunometrico ma è ancora utilizzato nella pratica clinica. Siccome diversi calibratori possono essere usati nella stessa metodica e possono influenzare i valori assoluti del GH, il valore di *cut-off* utilizzato dovrebbe dipendere anche dal tipo di calibratore utilizzato.

In accordo con le più recenti raccomandazioni internazionali sulla standardizzazione del dosaggio del GH, solo la forma ricombinante da 22 kDa dovrebbe essere impiegata come calibratore e il valore dell'ormone della crescita espresso in termini di unità massa. Infatti, l'uso di due differenti unità di misura (mU/L per IS 80/505 e µg/L per 98/754) e l'uso di varie formule di conversione ha contribuito ad aumentare la discrepanza tra i risultati del GH [12-13]. Per queste ragioni dal 2006 i valori di GH sono espressi in microgrammi per litro e ottenuti utilizzando il calibratore 98/574 con il metodo Immulite [14]. Aumentando la standardizzazione del dosaggio del GH si avranno vantaggi nelle decisioni cliniche per i bambini con alterazioni della crescita, soprattutto in merito alla scelta dei pazienti da trattare. Infatti, uno stesso paziente potrebbe risultare meritevole o meno di terapia sostitutiva con ormone della crescita, in rapporto alla metodica utilizzata per il dosaggio del GH nei test di stimolazione.

In conclusione, sta diventando sempre più importante raggiungere metodiche standardizzate nella misurazione del GH [15-16]. In ogni caso, i clinici dovrebbero essere consapevoli che la diagnosi di deficit del GH è prevalentemente clinica e basata su dati auxologici e che i test di stimolo rappresentano solo una conferma.

## Tabelle e figure

**Tabella 1. Dati clinici dei soggetti arruolati nello studio. I dati sono espressi in media±deviazione standard.**

<b>Età cronologica (anni)</b>	11.4±3.1
<b>Altezza (SDS)</b>	-2.1±0.6
<b>Velocità di crescita (SDS)</b>	-2.3±1.5
<b>IGF-I (SDS)</b>	-1.2±0.9
<b>Età scheletrica (anni)</b>	9.9±3.2
<b>Altezza target (SDS)</b>	-0.5±0.8

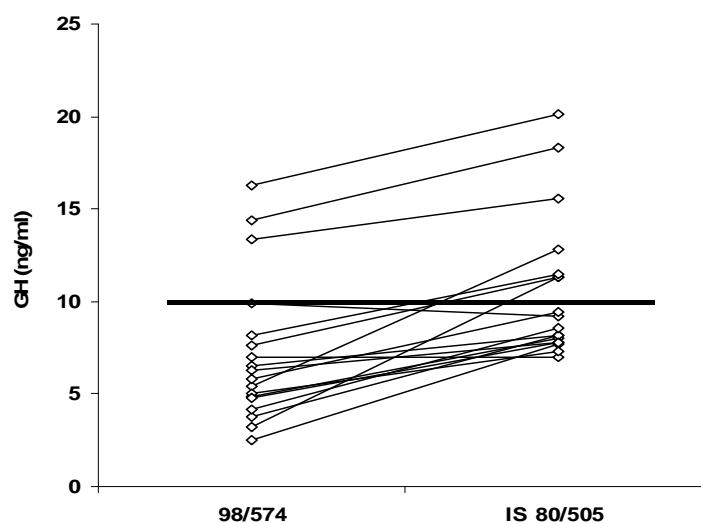


Figura 1. Livelli di GH dopo stimolo farmacologico misurati con Immulite, usando i calibratori IS 80/505 di origine ipofisaria o 98/574 ricombinante umano. La linea orizzontale rappresenta il valore di cut-off di 10 ng/ml.

### Bibliografia

1. GH Research Society. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: Summary Statement of the GH Research Society. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000;85:3990-3993.
2. Obara-Moszyńska M, Kedzia A, Korman E et al. Usefulness of growth hormone (GH) stimulation tests and IGF-I concentration measurement in GH deficiency diagnosis. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2008;21:569-579.
3. Bidlingmaier M, Freda PU. Measurement of human growth hormone by immunoassay: current status, unsolved problems and clinical consequences. *Growth Hormone & IGF Research* 2010;20:19-25.
4. Fisker S, Orskov H. Factors modifying growth hormone estimates in immunoassays. *Hormone Research* 1996;46:183-187.
5. Chaler E, Belgorosky A, Maceiras M et al. Between-assay differences in serum GH measurements: importance in the diagnosis of GH deficiency in childhood. *Clinical Chemistry* 2001;47:1735-1738.
6. Clemmons DR. Consensus statement on the standardization and evaluation of growth hormone and insulin-like growth factor assays. *Clinical Chemistry* 2011;57:555-559.
7. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity and weight velocity: British children, 1965. I. *Archives of Disease in Childhood* 1966;41:454-471.
8. Boquete HR, Sobrado PG, Fideleff HL et al. Evaluation of diagnostic accuracy of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 in growth hormone-deficient children and adults using ROC plot analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003;88:4702-4708.
9. Hasegawa Y, Hasegawa T, Takada M et al. Plasma free insulin-like growth factor I concentrations in growth hormone deficiency in children and adolescents. *European Journal of Endocrinology* 1996;134:184-189.
10. Galluzzi F, Quaranta MR, Salti R et al. Are IGF-I and IGF-BP3 useful for diagnosing growth hormone deficiency in children of short stature? *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2010;23:1273-1279.
11. Carrozza C, Lapolla R, Canu G et al. Human growth hormone (GH) immunoassay: standardization and clinical implications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2011;49:851-853.
12. Andersson AM, Orskov H, Ranke MB et al. Interpretation of growth hormone provocative tests: comparison of cut-off values in four European laboratories. *European Journal of Endocrinology* 1995;132:340-343.
13. Wieringa G, Barth J, Trainer P. Growth hormone assay standardization: a biased view? *Clinical Endocrinology* 2004;60:538-539.
14. Trainer PJ, Barth J, Sturgeon C et al. Consensus statement on the standardisation of GH assays. *European Journal of Endocrinology* 2006;155:1-2.
15. Sheppard MC. Growth hormone assay standardization: an important clinical advance. *Clinical Endocrinology* 2007;66:157-161.
16. Wood P. Growth hormone: its measurement and the need for assay harmonization. *Annals of Clinical Biochemistry* 2001;38:471-482.