

# Endocrinologia pediatrica e laboratorio

R.M. Dorizzi

*Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera di Verona*

... νυν δε με παρειπουσ αλοχοσ μαλακοισ επεεσσιν 'ορμεσ' εσ πολεμον\*...

Omero, Iliade, Libro 6 verso 337

Ernest H Starling: Croonian Lecture, 20 giugno 1905

\* Ora, tuttavia, mia moglie convincendomi con le giuste parole **mi spinge** alla battaglia

## Riassunto

L'articolo riassume brevemente le profonde radici cliniche dell'endocrinologia e dell'endocrinologia pediatrica. Vengono valutati i principali aspetti clinici degli ipostaturismi che hanno delle importanti ricadute di politica sanitaria. La diagnostica di questa patologia si basa ancora su test dinamici che sono poco fisiologici e poco riproducibili in laboratori diversi e nello stesso laboratorio. La determinazione del GH e dell'IGF-I presenta problemi legati alla scarsa standardizzazione dei reagenti e dei calibratori. Grande interesse clinico presenta anche la diagnostica relativa alle condizioni di pubertà precoce, pubertà ritardata ed ovaio policistico per le quali, a fronte di importanti ricadute nella vita del bambino o dell'adolescente che poi si estendono alla vita adulta, il laboratorio ha ancora pochi strumenti diagnostici. Non si possono rilevare, al momento, né un interesse delle numerose aziende che operano in questo ambito né l'attivazione di progetti strutturati di standardizzazione nazionale, o almeno multicentrica, con l'obiettivo di porre rimedio alla scarsissima omogeneità dei metodi analitici a disposizione del laboratorio e del clinico. Un problema molto importante è quello degli intervalli di riferimento pediatrici; l'urgenza di affrontare questo aspetto si estende ad una diagnostica molto comune come quella tiroidea. Un esame della più recente letteratura in questo ambito dimostra: 1) la limitatezza dei dati reperibili in banche dati come PubMed ed Embase; 2) parte rilevante di questi è relativa ad analizzatori e metodi che non sono più nemmeno commercializzati; 3) spesso i dati sono stati ottenuti in soggetti di riferimento poco confrontabili con quelli che accedono ai nostri laboratori.

## Summary

### Pediatric endocrinology and laboratory

The article shortly summarizes the deep clinical roots of Endocrinology and particularly of Pediatric Endocrinology. The principal clinical context of short stature and its effects on health policy are discussed. The investigation of short stature is still based on stimulation tests but they are nor physiological nor consistent not only in different laboratories but also in the same laboratory. The accurate measurement of growth hormone and IGF-I is hampered by lack of standardization of reagents and calibrators. Furthermore, the diagnosis of precocious puberty, delayed puberty and polycystic ovary syndrome is discussed; even if it is very important (these conditions, deeply affecting the quality of life of child, adolescent and adult) it is not very effectively supported by the clinical laboratory. Until now, the several manufacturers of in-vitro devices operating in the field did not show interest in participating or promoting national, or multi-center, programs for improving standardization of tests and analyzers. A major problem is the lack of proper pediatric reference intervals also concerning common tests such as thyroid function assays. An assessment of the recent literature on the subject demonstrated: 1) the few data stored in the major databases (e.g. PubMed and Embase); 2) most of the data have been obtained using methods and analyzers no more marketed or available; 3) the results have been very often obtained using population of different countries, continents and races.

**Tabella I.** Cause di ipostaturismo.

<i>malattie endocrine</i>	<i>malattie extra-endocrine</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- disordini dell'asse GH/IGF-I</li> <li>- disordini del metabolismo calcio-fosforico (rachitismo, pseudoipoparatiroidismo...)</li> <li>- ipotiroidismo</li> <li>- ipercortisolismo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cromosomiche (sindrome di Turner, sindrome di Down, ...)</li> <li>- scheletriche e dismorfiche (osteocondrodistrofie, acondroplasia, ...)</li> <li>- sindromi complesse (Silver-Russel, Prader-Willi, tesaurismi, ...)</li> <li>- sistemiche e croniche (cardiopatie, nefropatie, epatopatie, emopatie, infettive, malnutrizione, malassorbimento, fibrosi cistica)</li> </ul>

**Tabella II.** Eziologia dei defici di GH.

<i>congeniti (deficit di GH; insensibilità al GH)</i>	<i>acquisiti</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- da distress neonatale</li> <li>- da mutazione genetica: gene per il GH, per il recettore del GHRH, per il recettore del GH (s. di Laron),</li> <li>- delezione o mutazioni del gene dell'IGF-I</li> <li>- malformazioni della linea mediana con compromissione della zona ipotalamo-ipofisaria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tumori ipotalamo-ipofisari</li> <li>- istiocitosi X</li> <li>- malattie infiammatorie del SNC</li> <li>- idrocefalia</li> <li>- traumi cranici</li> <li>- anomalie vascolari</li> </ul>

## Le origini

L'endocrinologia muove i primi passi verso la metà del XIX secolo quando WB Carpenter nel suo "Cyclopedia of Anatomy and Physiology" (1852) intuisce il controllo endocrino del metabolismo intermedio "*the products [of the glands] destined to be restored to the circulating current, apparently in a state of more complete adaptiveness to the wants of the nutritive function*"<sup>1</sup>. Nel 1855 Claude Bernard usa l'espressione "secrezione interna" per indicare la liberazione del glucosio dal glicogeno epatico e Thomas Addison descrive la sindrome che prende il nome da lui. Charles Brown-Sequard rivendica nel 1893 sul British Medical Journal il merito di avere fondato l'Endocrinologia: *We assume that every single tissue and, in general, every separate cell of the organism secretes certain products or ferments which are poured into the blood current, and which influence every other cell. In this way a solidarity is established between all the cells of the organism by means other than the nervous system*<sup>2</sup>. Poco dopo, Oliver e Schaefer descrivono l'epinefrina e nel 1895 Schaefer precisa che: *Every part of the body does, in fact, take up materials from the blood, and does transform these into other materials. Having thus transformed them, they are ultimately returned into the circulating fluid and in that sense every tissue and organ of the body furnishes an internal secretion*<sup>3</sup>. Dobbiamo il termine ormoni ad Ernest H. Starling che la pronuncia per la prima volta nella Croonian Lecture "The chemical correlation of the functions of the body" del 20 giugno 1905 e pubblicata su Lancet il 5 agosto dello stesso anno. *These chemical messengers, however, or hormones (from ormao, I excite or arouse) as we might call them, have to be carried from the organ where they are produced to the organ which they affect by means of the blood stream and the continually recurring physiological needs of the organism must determine their repeated production and circulation throughout the body.* Il termine viene impiegato ripetutamente da Starling nella quarta Croonian Lecture di quell'anno, dedicata a tiroide, ovaio

e testicolo. La "fortuna" della nuova disciplina è attestata dagli 8500 riferimenti bibliografici (un centinaio dei quali pubblicati prima del 1899) del Trattato di Endocrinologia di Artur Biedl del 1910<sup>3</sup>.

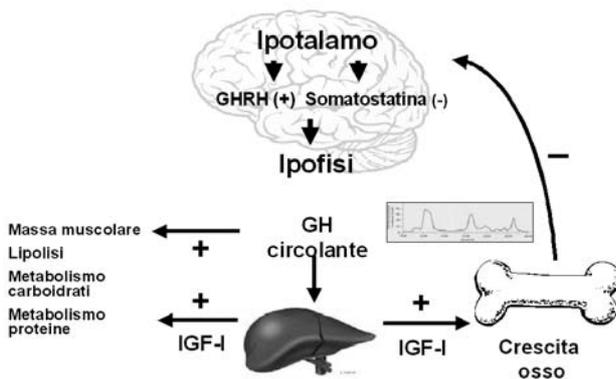
Da allora le conoscenze relative ai singoli ormoni si sono sviluppate attraverso una serie di tappe ben definite e costanti<sup>4</sup>:

1. identificazione del tessuto che produce un ormone;
2. messa a punto di un biosaggio per identificare l'ormone;
3. produzione di estratti con attività biologica;
4. isolamento, identificazione della struttura e sintesi dell'ormone.

Ne deriva che queste quattro tappe vedono collaborare strettamente i clinici, che ipotizzano l'esistenza di ormoni, i fisiologi ed i biochimici, che ne mettono a punto i metodi di analisi, ed ancora i clinici che verificano l'applicabilità degli strumenti messi a punto dalla tecnologia. La Medicina di Laboratorio ha un ruolo cruciale della "traduzione" biunivoca delle esigenze della clinica al ricercatore e di quanto ottenuto nella ricerca al paziente; l'endocrinologia pediatrica ne rappresenta un esempio significativo.

E' stato sostenuto che la crescita rappresenta, di per se stessa, un indicatore di salute e di benessere del neonato e del bambino e quindi il ruolo dell'endocrinologo pediatrico è maggiormente collegato, nella pratica clinica, alla pediatria nel suo complesso piuttosto che all'endocrinologia<sup>4</sup>.

L'Endocrinologia pediatrica è nata nel 1957; nel febbraio di quell'anno, infatti, Maurice S Raben cominciò a somministrare ad un giovane di 17 anni, alto 125 centimetri, estratti di ipofisi umane che contenevano ormone della crescita (GH)<sup>5</sup>. Partendo dall'osservazione che gli estratti di ipofisi di origine animale non erano efficaci, Raben aveva messo a punto un metodo di estrazione e purificazione delle ipofisi umane che



**Figura 1.** Regolazione della secrezione e dell'azione del GH.

consentiva di produrre materiale che poteva essere impiegato in clinica. Il rivoluzionario processo di purificazione dell'ipofisi è descritto su *Science* del maggio 1957 ed i primi risultati ottenuti in clinica appaiono tre mesi dopo sul *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Merita di essere ricordato che il mese precedente, Lawson Wilkins, il più famoso endocrinologo pediatra dell'epoca, aveva concluso sullo stesso giornale che un estratto di ipofisi (non preparato da Raben) non aveva portato ad alcun risultato<sup>6</sup>.

### Ipostaturismo GH/IGF-I correlato

La diagnostica e la terapia degli ipostaturismi è regolata in modo molto preciso dalla legislazione relativa alla prescrizione a carico del SSN. L'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) la limita nell'età evolutiva, su diagnosi e piano terapeutico di centri specializzati, a condizioni ben definite<sup>7</sup>:

a) *bassa statura da deficit di GH* definita dai seguenti parametri clinico-auxologici e di laboratorio: statura < -3 Deviazioni Standard (DS) oppure statura < -2DS e velocità di crescita/anno < -1DS rispetto alla norma per età e sesso, misurata a distanza di almeno 6 mesi con le stesse modalità; oppure velocità di crescita/anno < -2DS o < -1,5 DS dopo 2 anni consecutivi, anche in assenza di bassa statura; oppure malformazioni/lesioni ipotalamo-ipofisario dimostrate a livello neuroradiologico o difetti ipofisari multipli che comportino deficit di GH accertato in base ad una delle modalità del punto precedente, associata ad una delle seguenti condizioni:

- I. risposta di GH < 10 µg/L ad almeno 2 test farmacologici eseguiti in giorni differenti;
- II. risposta di GH < 20 µg/L nel caso uno dei 2 test impiegati sia GHRH + arginina o GHRH + piridostigmina
- III. secrezione spontanea media di GH nelle 24 ore, o quantomeno nelle 12 ore notturne < 3 µg/L in presenza di normale risposta ai test farmacologici e valori di IGF1 < -2 DS

b) *sindrome di Turner citogeneticamente dimostrata*

c) *deficit staturale nell'insufficienza renale cronica*

d) *sindrome di Prader Willi in soggetti prepuberi*

Secondo la nota 39 dell'AIFA i soggetti adulti con deficit di GH presentano un abbassamento della qualità di vita, una riduzione della forza muscolare, un aumento dell'adipe viscerale che, insieme ad un aumento del colesterolo circolante, costituisce un fattore di rischio per complicanze cardiovascolari. I dati disponibili, secondo l'AIFA non sono sufficienti a permettere l'uso del GH, anche se ammesso dall'FDA, in neonati *Small for Gestational Age* (SGA).

Il Comitato tecnico-scientifico dell'AIFA ricorda che circa venti anni fa venne introdotta la terapia con GH in bambini *short normal* (di statura -2,5 DS con normale produzione di GH endogeno). Anche se la terapia aumentò la velocità di crescita di questi bambini rispetto ai soggetti non trattati, la statura finale dei trattati e dei non trattati, una volta raggiunta la pubertà, risultò essere simile. Il GH provocava, sostanzialmente, un'espressione anticipata del potenziale di crescita geneticamente determinato.

La nota 39 dell'AIFA è molto documentata<sup>8-14</sup> ed è opportuno, a nostro avviso, che il laboratorista la tenga presente quando affronta la diagnostica degli ipostaturismi.

### Classificazione degli ipostaturismi

L'altezza di un individuo è il risultato della interazione tra il suo patrimonio genetico, lo stato nutrizionale, l'interazione di numerosi ormoni e numerose situazioni ambientali. La vita fetale rappresenta di gran lunga il momento della vita con la crescita maggiore (50-60 centimetri/anno) ed è critica nella definizione dell'altezza finale dell'individuo. La crescita è in gran parte indipendente dal GH ed è mediata dalla nutrizione materna e da fattori di crescita come l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF)-I e II. La scarsa correlazione tra altezza media dei genitori e dimensioni alla nascita ( $r = 0.3$ ) dimostra l'effetto dominante dell'ambiente intra-uterino rispetto al genotipo<sup>15</sup>. La nutrizione continua ad essere predominante per il primo anno di vita, mentre l'asse GH-IGF 1 "prende il sopravvento" in seguito. A partire dall'età di sei anni la velocità di crescita scende a circa 5 centimetri l'anno; mentre nell'infanzia la crescita dipende soprattutto da GH e tiroxina, nell'adolescenza dipende soprattutto da GH e da ormoni sessuali. Per ipostaturismo si intende una altezza al di sotto delle due DS della popolazione dello stesso gruppo etnico, età e sesso. La maggior parte dei bambini di bassa statura presenta una delle numerose malattie endocrine ed extraendocrine indicate nella Tabella I. L'eziologia del deficit di GH (prevalenza stimata tra 1/4000-1/10000 nati vivi/anno) è riassunta in Tabella II.

### GH

#### Biochimica

La secrezione di GH avviene in modo pulsatile ed è regolata principalmente da due neuropeptidi ipotala-

**Tabella III.** Cause fisiopatologiche di alterazione delle concentrazioni di GH.

<i>Diminuzione</i>	<i>Aumento</i>	
- età avanzata;	- esercizio fisico;	- cirrosi epatica;
- deficit selettivo e ipopituitarismo;	- sonno;	- disturbi dell'alimentazione
- obesità	- pubertà;	- acromegalia;
	- ipertiroidismo;	(malnutrizione/anoressia nervosa);
	- diabete mellito tipo I;	- insufficienza renale cronica;
		- depressione;
		- sepsi.

**Tabella IV.** Cause farmacologiche di alterazione delle concentrazioni di GH.

<i>Diminuzione</i>	<i>Aumento</i>	
- somatostatina;	- aminoacidi;	
- glucosio;	- dopamina;	
- acidi grassi;	- alfa-agonisti;	
- beta-agonisti;	- clonidina;	
- atropina;	- glucagone;	
- antimuscarinici (pirenzepina);	- beta-bloccanti;	
- glucocorticoidi ad alte dosi.	- teofillina;	
	- anticolinesterasici (piridostigmina);	
	- glucocorticoidi a basse dosi.	

mici, il *Growth Homone Releasing Hormone* (GHRH), ad azione stimolante, e la somatostatina, ad azione inibitoria (Fig. 1)<sup>16</sup>. Neurotrasmettitori, ormoni (IGF-I, steroidi gonadici e surrenalici, ormoni tiroidei, insulina...) ed altre molecole (glucosio, aminoacidi, acidi grassi liberi...) agiscono sulla secrezione somatotropa. Questo spiega perché la secrezione di GH è molto legata a sesso, età, stato nutrizionale e numerose variabili metaboliche ed ormonali periferiche come la GH-relina, un ormone prodotto soprattutto dallo stomaco che avrebbe la funzione principale di modulare gli adattamenti della secrezione somatotropa alle variazioni del bilancio energetico. Il GH, anche se esercita alcune azioni dirette, esercita la sua azione soprattutto stimolando la secrezione di IGF-I; si lega agli organi bersaglio, con uno specifico recettore di membrana, che circola, in parte (circa il 45%), come proteina di legame.

Oltre al deficit di GH possono essere considerate condizioni di iposecrezione dell'ormone condizioni come obesità, ipotiroidismo, ipercorticosurrenalismo e iperparatiroidismo (Tab. I, III e IV). Solo la contemporanea determinazione di GH e di IGF-I, consente di discriminare tra forme organiche e funzionali di iposecrezione. Vi possono essere anche delle condizioni di alterata sensibilità periferica al GH, funzionali e reversibili, che vanno differenziate dalla resistenza periferica congenita al GH, causata da una alterazione dell'attività del recettore del GH (nanismo di Laron).

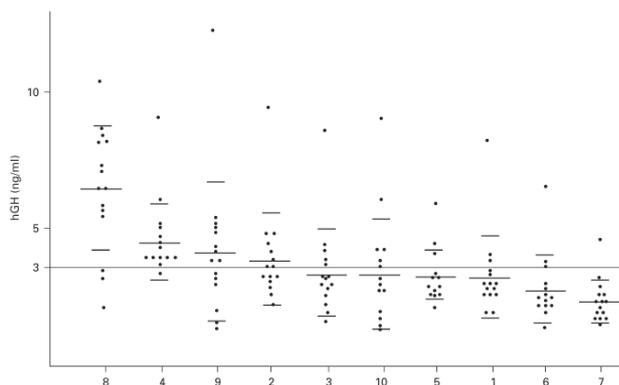
I processi di trascrizione e traduzione danno origine nell'ipofisi a due forme di GH: una di 22 kDa (22K) ed una di 20 kDa (20K) che presenta una bioattività in vitro minore (Tab.V). L'emivita in circolo del GH monomero 22 K è stimata tra i 10 ed i 20 minuti; il

GH 20 K ha una maggiore tendenza a formare dime-ri, che ne allunga l'emivita. La miscela delle molecole di GH circolante è variabile e questo ha delle implicazioni quando sono misurate con differenti metodi di dosaggio; essi rilevano in modo non uguale le diverse forme. Va ricordato, a tal proposito, che i campioni di base e quelli dopo stimolo possono contenere forme molecolari diverse<sup>17</sup>. Esiste una variante del GH prodotta dalla placenta in modo non pulsatile al termine della gravidanza, quando quasi tutto il GH in circolo è di origine placentare (15-20 µg/L), e la secrezione ipofisaria è soppressa da un feed-back negativo diretto e attraverso l'IGF-I.

Il GH si lega alla *GH-binding protein-1*(GHBP) ed alla *GH-binding protein-2*; la prima (60 kDa), con elevata affinità e limitata capacità di legame, deriva dal dominio extracellulare del recettore per il GH e lega circa la metà del GH circolante. La GHBP-2 (100 kDa), invece, ha una bassa affinità ed una alta capacità e trasporta il 10% del GH circolante<sup>18</sup>.

#### **Metodo di determinazione**

Poco si può aggiungere alle problematiche sui metodi di determinazione del GH a quanto hanno scritto negli anni recenti numerosi autori<sup>17-19</sup>. Metodi come l'*Eluted Stain bioAssay* (ESTA), il metodo immunometrico con rimozione del GH 22 K, il metodo per la determinazione del GH 20 K (a cui manca il segmento di proteina compresa tra gli aminoacidi 32 e 46) ed il metodo immunofunzionale hanno un ruolo solo nei laboratori di ricerca<sup>17</sup>. Nella pratica dei laboratori clinici il GH è misurato con metodi immunometrici: radioimmunologici, immunoradiometrici, immunoenzi-



**Figura 2.** Differenza dei risultati ottenuti nella determinazione del GH con metodi diversi (da rif. 29 modificato).

matici e in chemiluminescenza. Il metodo ideale per la determinazione del GH deve: 1) riflettere l'attività biologica dell'ormone; 2) essere abbastanza sensibile da richiedere volumi contenuti di campione; 3) consentire l'automazione ed una produttività molto elevata; 4) essere molto accurato e riproducibile.

Sono stati proposti anticorpi anti-GH policlonali, che danno risultati comparabili tra di loro, e monoclonali, che sono più sensibili e che danno risultati più bassi e meno comparabili. I metodi immunoradiometrici (IRMA) sono oggi poco usati se non in qualche variante immuno-enzimatica. Attualmente sono più utilizzati i metodi a doppio anticorpo monoclonale a *sandwich*, che impiegano traccianti enzimatici, fluorescenti e chemiluminescenti, e possono arrivare a sensibilità di 0.0001  $\mu\text{g/L}$ .

Le differenze dei risultati ottenuti con i diversi metodi dipendono da fattori come:

- *proteine leganti*: i diversi metodi riconoscono in misura quantitativamente diversa GH libero, GH legato alle *GH-binding protein* e GH totale.
- *isoforme*: in circolo sono presenti numerose isoforme, che comprendono monomeri ed oligomeri come il *big* GH ed il *big-big* GH, che cross-reagiscono in modo molto diverso con i vari metodi (Tab. V). Il grado con cui il metodo riconosce l'isoforma 20 K è correlato con l'inaccuratezza (si raccomanda pertanto di usare come calibratore la molecola 22 K prodotta con tecnica ricombinante).
- *problemi di standardizzazione*: i metodi di determinazione per il GH sono calibrati con materiali di riferimento che sono aggiornati periodicamente. Dopo l'identificazione negli anni '20 del GH come principio attivo che promuoveva la crescita, sono stati messi a punto dei biosaggi basati sull'aumento della massa corporea in ratti ipofisectomizzati. Solo nel 1955 è stato prodotto il primo Standard Internazionale (IS) denominato 55/1 da ipofisi bovina che è stato sostituito nel 1969 dalla Preparazione Internazionale di Riferimento (IRP 66/217) di origine umana. Dal 2001 è disponibile il Secondo Standard In-

**Tabella V.** Forme di GH immunoreattivo in circolo.

Forma	<i>k</i> -Da	legame	%
Monomero	22k-Da	libero	20%
		legato	22%
	20k-Da	libero	6%
		legato	2%
Dimeri	22k-Da		20%
	20k-Da		6%
Oligomeri	22k-Da		10%
	20k-Da		2%
Frammenti			Variabile

**Tabella VI.** Principali standard internazionali per il GH.

Anno	Standard
1955	55/1 I IS WHO
1962	66/217 IRP WHO
1982	80/505 IS WHO
1994	88/624 IS WHO
1998	98/574 II IS WHO

ternazionale (IS) 98/574, prodotto con tecnologia ricombinante, con un grado di purezza superiore al 95% che ha sostituito gli standard estrattivi, come lo IS 80/505 usato dal 1982 che conteneva una miscela di GH 20 K e 22 K, dimeri ed oligomeri di GH (Tab. VI). L'adozione dello standard 2<sup>nd</sup> IS 98/574 consente di adottare un fattore di conversione fisso (3 IU/mg) tra unità e microgrammi. Sono seguiti alcuni anni di intenso dibattito. Il *Groupe de travail* su "Evaluation des dosages des paramètres de l'axe somatotrope" della *Société Française de Biologie Clinique* (uno dei più attivi a livello internazionale) ha raccomandato l'adozione del siero come campione da utilizzare, dello standard 98/574, del calibratore 22 K, delle mIU/L come unità di misura mentre diversi gruppi clinici e laboratoristici anglosassoni hanno raccomandato l'impiego dello stesso calibratore, IS 98/574, e l'adozione dell'unità di misura di massa ( $\mu\text{g/L}$ )<sup>19</sup>. Quest'ultima posizione sembra avere preso il sopravvento negli ultimi mesi e deve essere recepita anche nel nostro paese<sup>20-23</sup>.

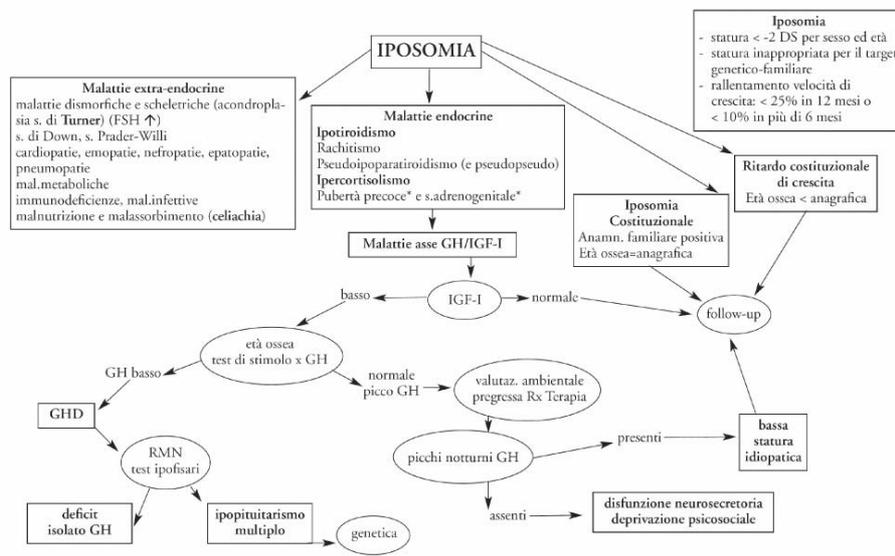
Va inoltre ricordato che la diffusione dei metodi automatici basati su anticorpi monoclonali ha causato un preoccupante deterioramento della confrontabilità dei metodi piuttosto che un miglioramento (Fig. 2). Non è molto semplice da comprendere come metodi che producono risultati così diversi, come quelli presentati in Figura 3 possano avere dei valori di cut-off identici. A nostra conoscenza questa situazione è stata affrontata, per il momento, in modo pragmatico ed efficace solo in Giappone, dove il *Growth Hormone and its related factors study Committee* della *Foundation for Growth Science*, dopo avere confrontato i risultati forniti dai sei metodi

Metodo	Rivelazione	Ab cattura/ rivelazione	Standard	Limiti linearità (mU/L)		Fattore di conversione (µg/L -> mU/L)	Specificità GH 20K	CV dichiarato
				Inferiore (o sensibilità)	Superiore			
Access	LM	MC/PC	GH ?	0.008	130	2.6	< 3,7	2.3
Brahms	<sup>125</sup> I	MC/MC	?	0.2	98	2	?	1.5
Cis Bio	<sup>125</sup> I	MC/MC	GH purificato	0.02	52.4	1.2	5	4
Diasorin	<sup>125</sup> I	MC/MC	?	0.4	100	2	100	2.8
DPC	CLM	MC/PC	GH estratto	0.08	104	2.6	63%	3.5
Tosoh	FL	MC/MC	?	0.26	156	2.6	< 5	?
Immunotech	<sup>125</sup> I	MC/MC	?	0.1	100	2	< 5	1.3
Nichols	LM	MC/PC	?	0.02	125	2.5	47	2.0
Delfia	FL	MC/MC	rhGH	0.03	100	2.6	< 0.001	1.1

Tutti questi metodi misurano il GH su campione di siero con riferimento allo standard internazionale 80/505

<sup>125</sup>I Iodio 125; CLM chemiluminescenza; FL Fluorimetria; LM luminescenza; MC monoclonale; PC policlonale; ? non dichiarato

Figura 3. Architettura di alcuni dei metodi analitici commercializzati per la determinazione del GH (da rif. 30 modificato).



\* sono associate a velocità di crescita aumentata e precoce saldatura delle epifisi (età ossea > anagrafica) con statura definitiva bassa

Figura 4. Algoritmo per la diagnosi dell'iposomia (da rif. 30 modificata).

commercializzati in quel paese, ha dimostrato che, anche se la correlazione tra di essi era molto buona ( $r=0.99$ ), i risultati potevano avere differenza anche maggiori al 100%<sup>24</sup>. E' stata, pertanto, messa a punto una formula di conversione tra i diversi dosaggi che ha ridotto la variabilità fra i metodi anche se quelli che impiegavano un anticorpo monoclonale producevano risultati più bassi del 60%. L'*Hypothalamo-Pituitary Disorder Study Group* del Ministero della Salute Giapponese ha quindi abbassato il valore del cut-off diagnostico per il Deficit di GH (GHD) a 6 µg/L.

Un singolo valore di concentrazione di GH fornisce scarse informazioni per quanto riguarda la valutazione del sospetto di deficit di secrezione, in quanto l'ipofisi

produce il GH in modo pulsatile con picchi notturni che compaiono un'ora dopo l'inizio del sonno, di frequenza ed ampiezza diversi nelle diverse età e le concentrazioni dell'ormone sono al di sotto del limite di rivelabilità per la maggior parte della giornata ed intervallate da picchi secretori nelle 24 ore.

Si deve, pertanto, ricorrere a valutazioni dinamiche con i limiti che sono stati ripetutamente evidenziati<sup>25-30</sup>. Infatti, i test provocativi non sono fisiologici, non sono ripetibili, utilizzano cut-off arbitrari, sono dipendenti dall'età e dalla maturazione dell'assetto gonadico e vengono valutati con dosaggi il cui potere discriminatorio è molto variabile.

Tuttavia, l'impiego di questi test è il sistema più utiliz-

**Tabella VII.** Cause di alterazione delle concentrazioni di IGF-I (da rif. 30 modificato).

<i>Diminuzione</i>	<i>Aumento</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- età;</li> <li>- deficit selettivo di GH e ipopituitarismo;</li> <li>- disturbi dell'alimentazione (malnutrizione/anoressia nervosa);</li> <li>- diabete mellito 1°;</li> <li>- cirrosi epatica;</li> <li>- insufficienza renale cronica;</li> <li>- ipotiroidismo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pubertà;</li> <li>- acromegalia;</li> <li>- ipertiroidismo;</li> <li>- obesità.</li> </ul>

zato per porre diagnosi di GHD, considerato che sono richiesti specificatamente dalla nota 39 dell'AIFA e che le concentrazioni integrate di GH in 12/24 ore presentano complessità logistiche e costi elevati. I test impiegati più comunemente si basano sulla somministrazione di Clonidina, Arginina, ipoglicemia insulina-indotta (ITT) ed Arginina+GHRH<sup>30</sup>. È oggi meno frequente rispetto al passato l'uso del "Priming" (la ripetizione in fase prepuberale dei test di stimolo dopo attivazione puberale).

Per districarsi nella fitta ragnatela di limiti, possibilità tecnologiche e raccomandazioni delle Società Scientifiche di Medicina di Laboratorio e cliniche, è indispensabile incentivare il collegamento dei diversi *stakeholder*: laboratorio, clinici, aziende di diagnostici e pazienti. L'algoritmo della Figura 4 rappresenta un esempio di approccio integrato alla diagnostica dell'iposomia<sup>30</sup>.

## IGF-I

### Fisiologia

L'IGF-I è un peptide di 70 aminoacidi con un peso molecolare di 7000 KDa prodotto ubiquitariamente anche se la quota circolante maggiore è prodotta a livello epatico sotto stimolazione del GH. L'ipotesi classica dell'azione della somatomedina (1950) che prevedeva che il GH controllasse la crescita attraverso l'IGF-I, è stata rivista nel 1980 (il GH aumenta la produzione di IGF-I sia a livello epatico che a livello periferico) e nel 2000 (l'IGF-I può non essere essenziale per gli effetti del GH IGF-I mediati)<sup>31</sup>. Circa la metà degli aminoacidi dei tre peptidi che compongono la famiglia IGF, insulina, IGF-I e IGF-II, sono comuni. L'insulina ha una concentrazione di picomoli ed una emivita di minuti, mentre le IGF hanno una concentrazione molto più alta (nanomoli), sono prodotte principalmente dal fegato e sono in gran parte legate ad una delle sei proteine leganti l'IGF-I che ne modulano l'attività. L'IGF-I, diversamente dal GH, ha livelli costanti con emivita di 8-10 ore, ma risente molto dello stato nutrizionale (Tab. VII). Non è soggetto a variazioni nel corso del giorno o all'effetto di stress, sonno, esercizio fisico o dieta<sup>32-35</sup>. Le IGF circolano legate a proteine a peso molecolare elevato e le IGF-Binding Proteins (IGF-BP) limitano l'accesso delle IGF ai tessuti ed ai recettori; l'IGFBP 3 lega più del 95% dell'IGF circolante e le

due molecole, insieme alla sub-unità acido-labile, formano un complesso che ne allunga l'emivita. IGF-I ed IGF-II, una volta liberate dalle BP, diventano metabolicamente attive e capaci di legarsi a specifici recettori trans-membrana ad elevata attività e, quindi, di entrare nei tessuti bersaglio.

### Metodo di determinazione

Le IGF possono essere misurate con numerosi metodi, *bioassay* (in cui la bioattività di IGF-I e IGF-II è misurata con condrociti di coniglio, cartilagine di pollo o porcina), metodi radiorecettoriali ed immunometrici. I primi dosaggi immunologici erano basati su metodi a doppio anticorpo in presenza o assenza di equilibrio e sull'uso di traccianti iodati e di standard calibrati sulla preparazione IGF-I 87/518 del WHO. Poiché le IGF-BP mascherano gli epitopi dell'IGF-I o competono con questi, i dosaggi immunometrici devono essere preceduti dalla rimozione delle IGFBP. Il metodo di riferimento è quello che si basa sulla denaturazione dell'ALS (precipitazione acido-alcolica e crio-precipitazione) e separazione cromatografica dell'IGF-I. Anche se i metodi che prevedono fasi estrattive limitano i problemi associati alla presenza di proteine vettrici e proteasi sieriche, i metodi più usati sono quelli RIA e quelli basati su traccianti chemiluminescenti che assicurano una reazione crociata minima (inferiore al 3%) con l'IGF-II<sup>36-38</sup>. Alcuni metodi automatici si basano sull'impiego di un eccesso di IGF-II che "blocca" le IGF-BP.

I valori di riferimento dell'IGF-I sono dipendenti dall'età e dal sesso (nel corso dell'infanzia sono in genere più alti nella femmina), anche se la concentrazione deve essere misurata con cautela nei primi tre anni di vita per la scarsa sensibilità dei metodi attualmente disponibili.

### Quadro clinico e biochimico dell'ipostaturismo

Nell'ipostaturismo al laboratorio clinico è richiesto di documentare (tranne che nei casi dipendenti da difetto genetico del recettore del GH o del gene per IGF-I o suo recettore) una ridotta concentrazione del GH sia spontanea che indotta dagli stimoli secretagoghi (nei deficit ipofisari di GH) ovvero una ridotta se-

**Tabella VIII.** Sensibilità (Sens), specificità (Spec), Likelihood ratio positivo (LR+) e negativo (LR-), Diagnostic Odds Ratio (DOR) e Number Needed to Diagnosis (NND) dell'IGF-I nella diagnosi di ipostaturismo (INF= Infinito).

<i>Autore</i>	<i>Sens</i>	<i>Spec</i>	<i>LR+</i>	<i>LR-</i>	<i>DOR</i>	<i>NND</i>
Boquete et al. <sup>28</sup>	68	97	22.67	0.33	68.7	1.5
Bussieres et al. <sup>23</sup>	72	95	14.40	0.29	48.9	1.5
Cianfarani et al. <sup>15</sup>	75	90	7.50	0.28	27.0	1.5
Cianfarani et al. <sup>25</sup>	73	95	14.60	0.28	51.4	1.5
Cianfarani et al. <sup>30</sup>	69	100	INF	0.31	INF	1.4
Das et al. <sup>27</sup>	86	100	INF	0.14	INF	1.2
Granada et al. <sup>22</sup>	70	95	14.00	0.32	44.3	1.5
Juul et al. <sup>17</sup>	53	98	26.50	0.48	55.3	2.0
Mitchell et al. <sup>20</sup>	62	47	1.17	0.81	1.4	11.1
Nunez et al. <sup>16</sup>	69	76	2.88	0.41	7.0	2.2
Ranke et al. <sup>24</sup>	75	32	1.10	0.78	1.4	14.3
Rikken et al. <sup>19</sup>	65	78	2.95	0.45	6.6	2.3
Tillman et al. <sup>18</sup>	34	72	1.21	0.92	1.3	16.7

crezione spontanea con normale secrezione dopo test di stimolo (nei difetti di secrezione neuroendocrina).

Segni clinici che possono dare il sospetto di GHD sono il rilievo di micropene nel maschio, facies con naso insellato e bozze frontali prominenti, ipoglicemia neonatale, età ossea ritardata, aumento della massa grassa rispetto alla massa magra, labio-palatoschisi, incisivo unico, displasia setto-ottica.

Una concentrazione di IGF-I all'interno dell'intervallo di riferimento, anche considerando l'età cronologica e l'età ossea del paziente, esclude la presenza di GHD mentre un valore ridotto può dipendere da un difetto dell'asse GH/IGF-I o da altre cause (Tab. I e II).

### Criteri diagnostici

Nonostante le considerazioni precedenti, la diagnosi di GHD deve basarsi nel nostro paese su quanto previsto della Nota AIFA 39 relativamente alla prescrivibilità (e rimborsabilità) del trattamento sostitutivo con GH. La Società Italiana di Endocrinologia Pediatrica ha proposto recentemente un algoritmo per la diagnosi del GHD, che si basa sulla determinazione dell'IGF-I piuttosto che su quella del GH, soprattutto nella fase prepuberale (Fig. 5)<sup>39</sup>. La Tabella VIII raccoglie i dati di sensibilità, specificità, Likelihood ratio positivo (LR+) e negativo (LR-), Diagnostic Odds Ratio (DOR) e Number Needed to Diagnosis (NND) che possono essere ricavati dalle informazioni contenute nell'articolo. I valori elevati di DOR e bassi di NND documentano la buona affidabilità diagnostica di questo approccio. Il documento conclude con la raccomandazione di preferire la determinazione dell'IGF-I considerata l'inadeguatezza dei criteri diagnostici attuali basati sul GH.

Il caso particolare del bambino SGA è stato affrontato congiuntamente nei mesi scorsi dalle più importanti Società di Endocrinologia Pediatrica e dalla

Growth Hormone Research Society, che hanno concluso che la diagnosi si deve basare su indagini antropometriche accurate e che la determinazione di GH, IGF-I e IGF-BP3 rivestono una limitata utilità diagnostica e prognostica<sup>40</sup>.

### Pubertà precoce

La maturazione sessuale nella specie umana richiede un numero variabile di anni e si conclude ad un'età che può variare molto (anche 4-5 anni) in soggetti sani che vivono nella stessa area. Tale variabilità dipende da fattori genetici, razziali, nutrizionali ed i limiti per definire la pubertà precoce (PP) che si definisce come l'inizio dello sviluppo puberale con un anticipo di più di 2.5 DS rispetto la media, devono essere definiti localmente e devono essere verificati periodicamente. Non è facile valutare l'incidenza e la prevalenza della PP anche in relazione al trend di anticipo della maturazione sessuale nel corso degli ultimi decenni<sup>41-43</sup>. L'età media del menarca è scesa negli Stati Uniti dalla metà del XVIII secolo alla metà del secolo scorso da 17 a 14 anni; nel 1973 è stata stimata in 12.8 anni ed era simile a quella rilevata in Europa, dove si abbassava di 0.3 anni per decade in Finlandia e di 0.175 anni per decade in Francia. Secondo lo studio del 1997 dell'American Academy of Pediatrics- Pediatric Research in Office Settings (PROS) su più di 17000 ragazze, l'età media del menarca nelle bianche era di 10 anni e nelle afro-americane di 8.9 anni, con i limiti inferiori (<2 DS) rispettivamente di 6.3 e 5 anni<sup>44</sup>. L'articolo concludeva che la maggior parte delle bambine con alterazioni puberali dopo i 6 anni (afro-americane) o 7 anni (caucasiche) non richiedeva ulteriori valutazioni. Questo studio è stato seguito da una salva di segnalazioni relative ad aree geografiche e metodi di valutazione diversi e poco confrontabili che non sempre hanno confermato i risultati<sup>45-49</sup>. Una possibile spiegazione è quella che, mentre l'età del menarca si è stabilizzata intorno ai 12 anni,

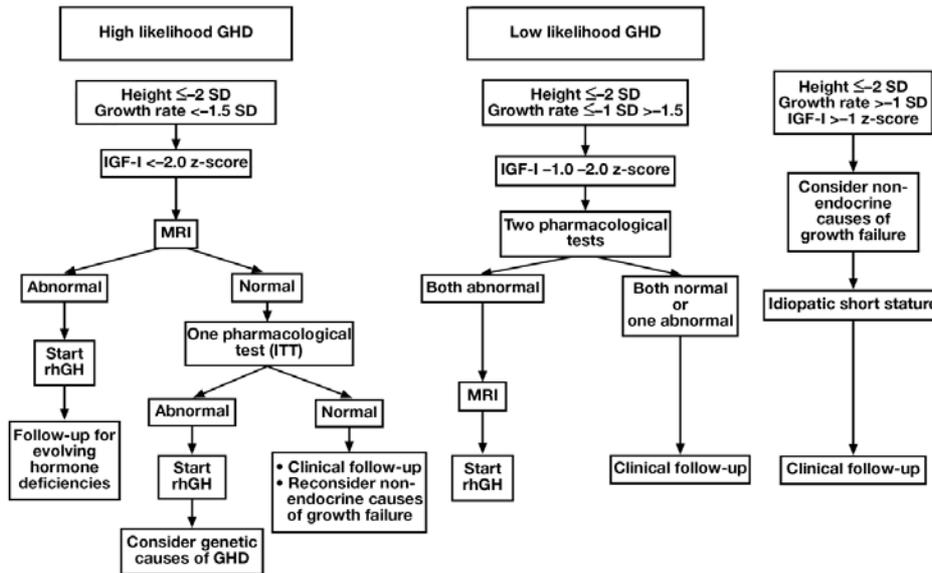


Figura 5. Algoritmo proposto dalla Società Italiana di Endocrinologia Pediatrica per la diagnosi del GHD che si basa sulla determinazione dell'IGF-I (da rif. 39 modificata).

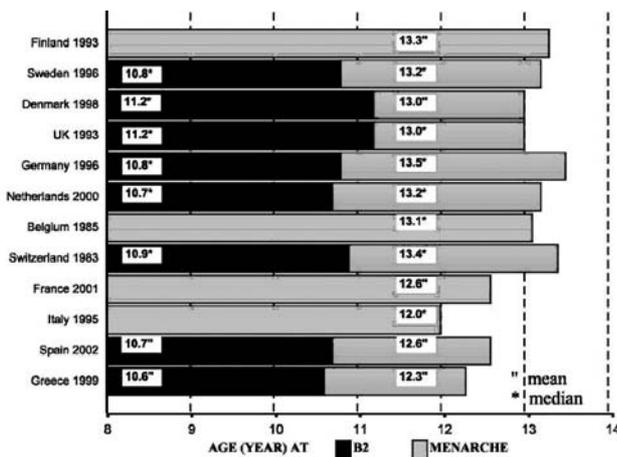


Figura 6. Gradiente nord-sud nella comparsa del menarca in Europa (da rif. 43 modificata).

quella del telarca tende ad anticipare. In Danimarca i registri nazionali hanno dimostrato tra il 1993 ed il 2001 una incidenza di PP di 20 su 10000 femmine e 5 per 10000 maschi. La diagnosi finale in circa la metà dei pazienti era di PP centrale, mentre negli altri casi era telarca o adrenarca precoce o sviluppo puberale normale anticipato. La Figura 6 mostra il gradiente Nord-Sud che si registra in Europa; l'età media del menarca va dai 12 anni in Italia ai 13.5 nella parte Orientale della Germania. Interessanti sono anche le segnalazioni che in paesi come Cina, Giappone e India il menarca è anticipato in relazione alla classe sociale ed economica a cui appartiene la ragazza e che la PP è più frequente nei casi di adozione internazionale, in particolare per bambine provenienti dall'India e dallo Sri-Lanka.

Due processi contribuiscono alle manifestazioni fisiche della pubertà; l'adrenarca ed il gonadarca. L'adre-

narca si verifica tra i 6 e gli 8 anni di età con un aumento della secrezione androgenica ed è accompagnato da variazioni dell'unità pilo-sebacea, transitorio accrescimento e comparsa di peli ascellari e pubici senza sviluppo sessuale. Dal punto di vista biochimico inizia quando la zona reticolare del surrene comincia a produrre il deidroepi-androsterone solfato (DEA-S). Anche se il DEA-S viene considerato un "androgeno debole", deve essere ricordato che si lega molto scarsamente al recettore per gli androgeni e viene convertito in sede periferica a testosterone e di-idrottestosterone. Il gonadarca è iniziato dai macroneuroni dell'ipotalamo che producono ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH) in modo pulsatile che regola la liberazione di FSH ed LH da parte dell'ipofisi anteriore.

Si verifica, successivamente, una armonica maturazione dei caratteri sessuali secondari (Fig. 7 e 8) attraverso le 5 fasi descritte da Tanner e Marshall<sup>41</sup>.

La Prevalenza della PP nella popolazione generale è stata stimata intorno a 0.2-0.6%, con rapporto F/M 4-20:1 e può essere classificata, sulla base della eziologia in:

1) PP vera o centrale isosessuale (gonadotropino-dipendente) in cui le caratteristiche sessuali sono coerenti con il sesso del bambino:

- idiopatica (nel 97% delle femmine e nello 0% dei maschi);
- tumori del SNC (amartomi del *tuber cinereum*, astrocitomi, ependimomi, pinealomi);
- alterazioni del SNC congenite (neurofibromatosi, idrocefalo) ed acquisite (malattie infiammatorie, traumi);
- secondaria ad esposizione prolungata a steroidi sessuali (sindrome adrenogenitale);
- ipotiroidismo primario;

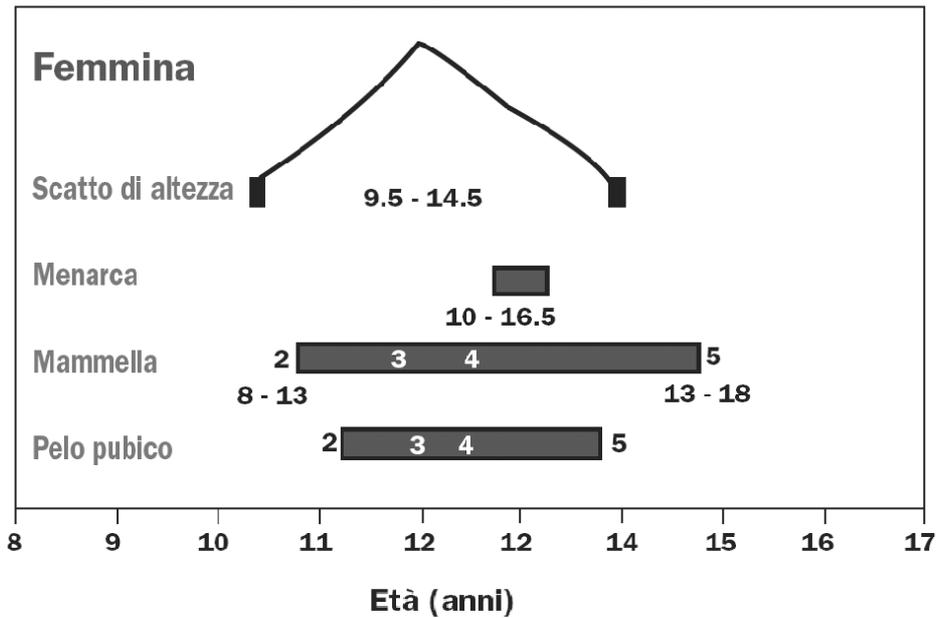


Figura 7. Cronologia degli eventi della pubertà nella femmina (da rif. 30 modificato).

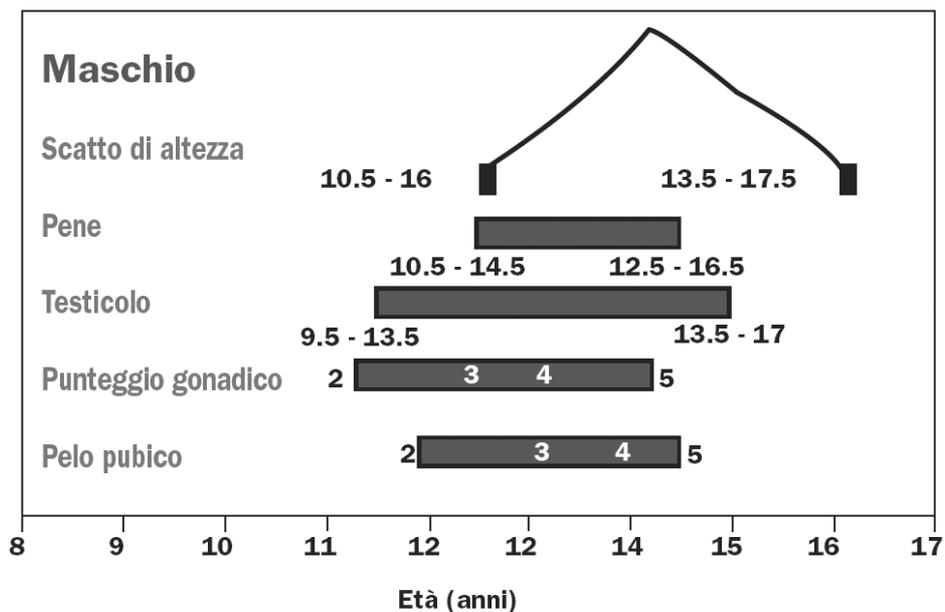


Figura 8. Cronologia degli eventi della pubertà nel maschio (da rif. 30 modificato).

- pregressa irradiazione del SNC.

2) *Pseudopubertà precoce* (*GnRH e gonadotropino-indipendente*) isosessuale e controsessuale, causata da una secrezione aumentata di ormoni sessuali (estrogeni ed androgeni che derivano dalle gonadi o dal surrene):

- cisti e tumori ovarici che si presentano spesso con un episodio di sanguinamento vaginale (femmina);
- Leydigoma, tumore hCG-secrente delle cellule germinali, testotossicosi (maschio);
- sindrome adrenogenitale, tumori surrenalici andro-

geno- o estrogeno-secerenti, estrogeni esogeni (femmina e maschio).

3) Precocità sessuale incompleta (variante della pubertà normale con sviluppo dei caratteri sessuali secondari):

- telarca prematuro (non accompagnato da altri segni di sviluppo puberale; nel 20% dei casi è seguito da PP);
- adrenarca prematuro (nel 20% dei casi è seguito da PP).

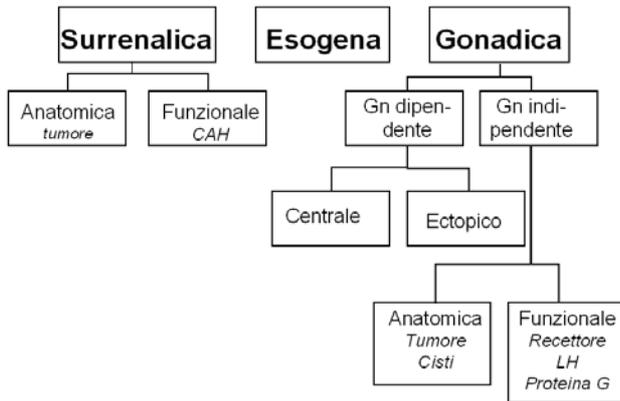


Figura 9. Algoritmo diagnostico per la pubertà precoce.

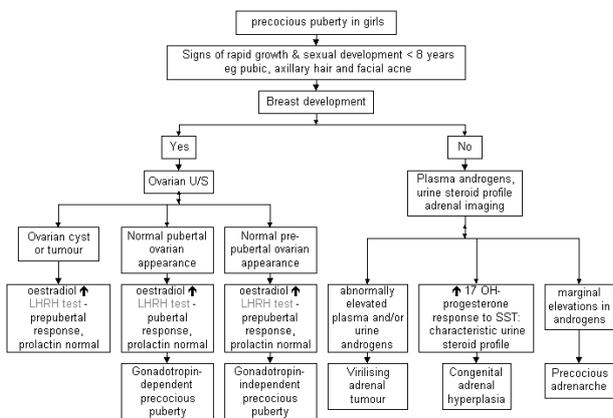


Figura 10. Algoritmo diagnostico per la pubertà precoce nella femmina.

Si può quindi concludere che la maggioranza delle ragazze che presentano telarca ed adrenarca tra i 6 ed i 7 anni richiede un attento monitoraggio della maturazione sessuale più che una valutazione neurologica, surrenalica ed ovarica esaustiva.

Un approccio equilibrato ed attraente dal punto di vista laboratoristico appare quello molto pragmatico di un gruppo di pediatri di Little Rock<sup>50</sup>. Nelle ragazze con solo telarca senza accelerazione delle crescita e della maturazione scheletrica, deve essere indagata l'esposizione ad estrogeni e devono essere misurati estradiolo, FSH ed LH. In presenza di adrenarca devono essere misurati anche testosterone, DEA-S ed androstenedione. Se crescita e maturazione ossea sono accelerate e la concentrazione delle gonadotropine è a livelli puberali, trova indicazione la risonanza magnetica. Nel caso di concentrazione delle gonadotropine bassa, trova indicazione un test al GnRH (o nell'attuale non disponibilità commerciale di GnRH naturale, un test al GnRH agonista). Un aumento di LH dopo stimolo < 7 U/L ed un rapporto del FSH/LH > 1 orientano verso il telarca prematuro isolato, un valore picco di LH > 7 U/L ed un rapporto FSH/LH < 1 verso la pubertà precoce centrale, mentre bassi livelli di entrambi orientano verso la pubertà precoce periferica. A questo ri-

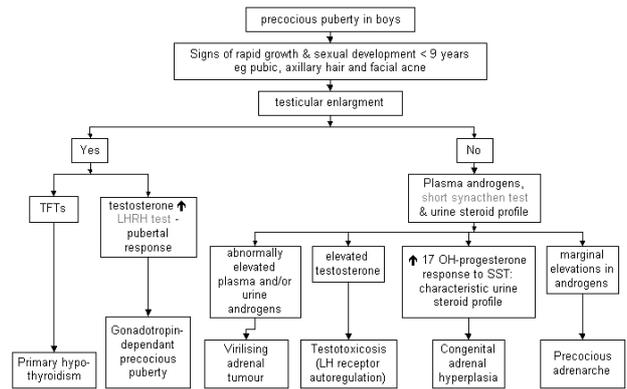


Figura 11. Algoritmo diagnostico per la pubertà precoce nel maschio.

guardo deve essere segnalato un particolare *caveat* nell'interpretazione dei valori di cut-off presenti in letteratura. Per esempio, non è dimostrato che i valori proposti per l'analizzatore AutoDELFA, poco diffuso nel nostro paese (LH e FSH basali < 0.6 UI/L nei due sessi, LH dopo GnRH >9.6 U/L nel maschio e > 6.9 UI/L nelle femmine; testosterone >190 ng/L nel maschio ed estradiolo > 13.6 ng/L nella femmina) siano trasferibili ad altri analizzatori<sup>51</sup>. Il cortisolo, eventualmente dopo somministrazione di ACTH, ed il TSH vanno misurati solo nei casi di sospetto clinico di patologia surrenalica o un ipotiroidismo. L'algoritmo di Figura 9 riassume come livelli anomali di steroidi sessuali possono avere origine esogena o endogena (surrene o gonadi). Se l'origine è gonadica, deve essere determinato se la produzione di steroidi sessuali deriva dalla attività delle gonadotropine. La PP che deriva dalle gonadotropine può originare da una disregolazione centrale, che porta ad una eccessiva produzione di LH ed FSH, o da dalla produzione ectopica di ormone, di solito per una neoplasia che produce hCG. Le Figure 9, 10, 11 e 12 esemplificano alcuni algoritmi per il maschio e per la femmina che tengono conto di tale approccio.

La Nota 51 AIFA prevede la rimborsabilità degli analoghi dello LHRH ed in particolare della Leuprorelina (lo stimolo iniziale della produzione di FSH e LH è seguito dalla desensibilizzazione dei recettori ipofisari e dalla inibizione della produzione di entrambi gli ormoni gonadotropici) solo nella pubertà precoce di origine centrale.

La terapia per la pubertà precoce porta ad una completa cessazione del ciclo mestruale nelle ragazze, l'interruzione o un netto rallentamento della maturazione dei caratteri sessuali secondari, la ripresa di comportamenti adeguati all'età anagrafica e la prevenzione della maturazione scheletrica precoce.

### Pubertà ritardata

Anche i criteri diagnostici per la pubertà ritardata sono basati su criteri statistici (un ritardo, a seconda dei

	STEROIDI		LH, FSH		ALTRO
	gonadici	surrenali	basali	dopo GnRH	
<b>PUBERTÀ PRECOCE VERA (centrale)</b>					
	Aumentati (testosterone o estrogeni)	Normali per l'età	Aumentati	risposta LH>FSH	
<b>PSEUDOPUBERTÀ</b>					
<b>Germinoma hCG-secernente</b>	Aumentano testosterone	Normali per l'età	Diminuiti hCG aumentato	risposta FSH>LH	Marcatori tumorali
<b>Autonomia gonadica</b>	Aumentati (testosterone o estrogeni)	Normali per l'età	Diminuiti	risposta FSH>LH	
<b>Patologia surrenalica</b>	Prepuberali	Aumentati. Non sopprimibili (tumori). Aumento precursori (s.adrenogenitale)	Diminuiti	risposta FSH>LH	Valutare cortisolo
<b>PRECOCITÀ INCOMPLETA</b>					
<b>Telarca prematuro</b>	Prepuberale	Normali per l'età	Prepuberali	risposta FSH>LH	
<b>Adrenarca prematuro</b>	Prepuberali	Aumentati per l'età con risposta ad ACTH	Prepuberali	risposta FSH>LH	

**Figura 12.** Significato degli esami di laboratorio nella diagnostica di laboratorio nello studio della pubertà precoce (da rif. 30 modificato).

casi, di 2 o 3 DS della media dell'età dell'inizio della pubertà) e quindi arbitrari. La pubertà viene definita *ritardata* se la maturazione sessuale avviene dopo i 14 anni e si tratta di una situazione che interessa circa un adolescente su 40. Per gli altri casi si tratta di un ritardo costituzionale: questi giovani non presentano, alla fine della valutazione, nessuna patologia e la maturazione sessuale, una volta iniziata, si svolge regolarmente<sup>52-55</sup>. Presumibilmente, l'aumento puberale pulsatile del GnRH si sviluppa lentamente ritardando l'aumento degli ormoni sessuali steroidei e i loro effetti sui caratteri sessuali secondari e sulla secrezione del GH.

Il ritardo può avere molte cause che sono sintetizzate in Tabella IX.

La diagnosi può essere orientata, anche in questo caso, da un esame clinico attento che può individuare segni come anosmia, galattorea o ipotiroidismo. La misurazione delle gonadotropine può discriminare tra insufficienza congenita o acquisita da altre cause. Nell'adolescenza (età ossea tra 10 e 12 anni), la concentrazione di gonadotropine è marcatamente elevata nell'insufficienza gonadica; in questo caso può essere utile lo studio della mappa cromosomica. Se la concentrazione di gonadotropine è all'interno dell'intervallo di riferimento o più bassa, la diagnosi più frequente è quella di pubertà ritardata costituzionale, anche se è raccomandata una valutazione laboratoristica indirizzata verso la diagnosi di patologie croniche. È stato proposto un cut-off per la concentrazione di testosterone di 0.7 nmol/L per predire i maschi che avranno un testicolo di almeno 4 mL entro un anno (77%) o entro 15 mesi (100%)<sup>56</sup>.

La Nota 36 AIFA prevede la rimborsabilità degli ormoni androgeni (testosterone e metiltestosterone) nei casi di ipogonadismo maschile primitivo e secondario e nella pubertà ritardata.

### Sindrome dell'ovaio policistico

La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), la causa più frequente di irregolarità mestruale e di irsutismo nella donna dell'età fertile, si presenta frequentemente durante l'adolescenza (è stato stimato in almeno un

**Tabella IX.** Diagnosi differenziale della pubertà ritardata.

Secondaria a malattia cronica:

- anoressia nervosa;
- asma;
- difetti congeniti o acquisiti del sistema nervoso centrale;
- ipo-/ipertiroidismo;
- malattie infiammatorie croniche del sistema gastroenterico;
- malattie oncologiche (cranio-faringioma ed altri tumori cerebrali);
- insufficienza renale.

Ipogonadismo ipogonadotropo:

- sindrome di Kallmann;
- sindrome di Prader-Willi.

Ipogonadismo ipergonadotropo:

- disgenesia gonadica (sindrome di Turner);
- sindrome di Klinefelter;
- secondario a radioterapia;
- sindrome dell'ovaio resistente;
- sindrome dell'insensibilità agli androgeni.

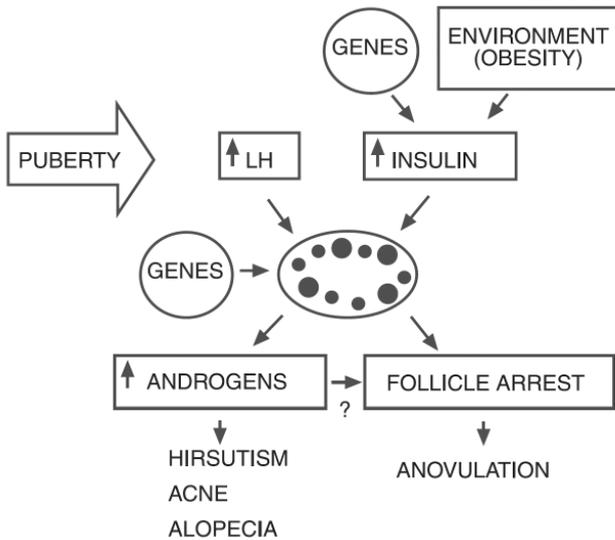


Figura 13. Attivazione della PCOS durante la pubertà ritardata.

quarto delle adolescenti). La PCOS è una sindrome eterogenea che comprende un iperandrogenismo cronico associato ad oligo-anovulazione, con possibile presenza di ovaio policistico. In circa la metà dei casi anche nelle adolescenti non è presente il classico quadro della sindrome di Stein-Leventhal e la concentrazione di LH e di testosterone sono all'interno dell'intervallo di riferimento<sup>57-59</sup>. Nella Figura 13 è illustrato come, nel corso dell'adolescenza, si verifichi un aumento della concentrazione di insulina (con una azione gonadotropica diretta sulla steroidogenesi ovarica) accompagnato da una diminuzione della concentrazione della *Sex Hormone Binding Globulin* che amplifica gli effetti degli ormoni sessuali<sup>60</sup>. Applicare i criteri diagnostici della PCOS nell'adolescenza è difficile poiché irsutismo, acne, irregolarità mestruali ed obesità sono molto frequenti in questa fascia di età. Molte delle adolescenti con irsutismo presentano una PCOS nonostante la regolarità delle mestruazioni. Le altre cause di irsutismo (malattia di Cushing, acromegalia, iperprolattinemia, tumori del surrene e dell'ovaio...) sono rare. Poiché i limiti della determinazione del testosterone totale e libero sono ben noti e sono stati anche recentemente discussi a livello molto autorevole, il valore di tale determinazione per la conferma dell'iperandrogenismo è molto incerto<sup>61</sup>. Sono state proposte anche delle diagnosi di esclusione della sindrome di Cushing (determinazione del cortisolo), del deficit di 21-beta-idrossilasi (determinazione di 17-idrossi-progesterone) e di tireopatie, iperprolattinemia ed acromegalia (determinazione di TSH, prolattina e IGF-I). In conclusione, l'aumento della concentrazione di LH e del rapporto LH/FSH sono elementi molto specifici ma poco sensibili (Fig. 14).

**Il problema degli intervalli di riferimento**

Ripetutamente nella precedente trattazione si è fatto

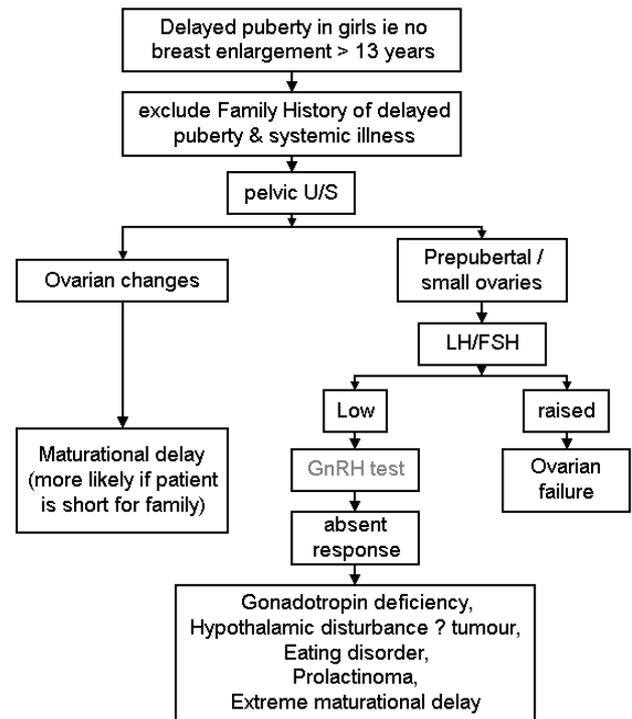


Figura 14. Algoritmo diagnostico per la pubertà ritardata.

riferimento a intervalli di riferimento ed a limiti decisionali. Solo raramente la letteratura, anche autorevole, indica la metodica analitica e le modalità statistiche impiegate per la definizione di tali valori. Le difficoltà della produzione degli intervalli di riferimento sono state discusse da Giavarina<sup>62</sup> e più recentemente da un Q-Probes Study del College of American Pathologists in 163 laboratori clinici statunitensi in gran parte ospedalieri (circa la metà con meno di 150 letti e circa il 10% con più di 450 letti)<sup>63</sup>. Gli autori concludono che raramente il laboratorio produce o “verifica” l'intervallo di riferimento, spesso si limita ad adottare i limiti proposti dal produttore o presenti in letteratura<sup>64-68</sup>. Va peraltro segnalato che questi autori non hanno trovato differenze tra gli intervalli derivati “dall'esterno” e quelli prodotti all'interno del laboratorio<sup>63</sup>. I bambini rappresentano un aspetto particolare della problematica degli intervalli di riferimento, in quanto sono degli individui “unici”, non degli adulti in miniatura; i neonati, ed in particolare i prematuri, presentano una funzione epatica, renale e polmonare immatura; negli anni in cui si “sveglia” l'orologio biologico della maturazione sessuale, le variazioni delle concentrazioni ormonali possono essere drammatiche. In ambito pediatrico ci troviamo di fronte a due difficoltà ulteriori: 1) solo di rado i produttori forniscono dati circa i “risultati attesi” in ambito pediatrico; 2) anche una sommaria ricognizione consente di distinguere, a questo riguardo, aziende “virtuose”<sup>69-76</sup> ed altre molto meno virtuose<sup>77-80</sup>; 3) la raccolta di campioni di sangue in bambini sani con il solo scopo di ottenere valori di riferimento non è conside-

rato eticamente accettabile. Questa situazione è stata affrontata con modalità diverse. Una è quella basata su metodi indiretti per la produzione di intervalli di riferimento o meglio “associati alla salute” (Health Related Limits) che si ricollegano agli studi pionieristici di 50 anni fa di Pryce<sup>81</sup> e Hoffmann<sup>82</sup>. Poiché è praticamente impossibile ottenere un campione di sangue da un numero adeguato di soggetti nella fascia di età compresa tra 1 giorno e 18 anni di vita, si può utilizzare quanto rimane del campione di sangue di bambini ed adolescenti ospedalizzati per patologie che non modificano l'analita di interesse. Tecniche per la rimozione degli outlier, che sono state impiegate, per esempio, da Soldin, possono produrre risultati assai interessanti. A tal riguardo va ricordato che, a rigore, questo approccio consente di superare uno dei limiti della modalità raccomandata dall'IFCC: quello di calcolare gli intervalli di riferimento su soggetti di riferimento “troppo sani” e che quindi possono essere addirittura fuorvianti quando sono impiegati nella pratica clinica. Soldin, Brugnara, Wong hanno raccolto, in un volume sicuramente interessante, degli intervalli di riferimento degli esami eseguiti per valutare la diagnosi di patologie come la pubertà precoce, la pubertà ritardata e l'ovaio policistico, contenuti in articoli pubblicati più di 30 anni fa, ottenuti con analizzatori che non sono più nemmeno commercializzati<sup>83</sup>. Concretamente esistono, a nostro avviso, tre sole possibilità per migliorare la situazione:

- 1) “costringere” le aziende ad imitare quelle “*best of the breed*” (che producono delle raccolte di intervalli molto valide per qualità e quantità dei dati). Se la professione sarà sempre più sistematica e compatta, è verosimile che questo avvenga in tempi rapidi;
- 2) creare reti di laboratori che possa, sulla stregua del progetto canadese CALIPER, produrre una banca dati sufficiente per ottenere dati validi<sup>84,85</sup>;
- 3) adottare in modo più diffuso tecniche di *data mining* e “metodi indiretti” che hanno già dato, anche nelle nostre mani, buoni risultati.

Una recente revisione di quanto è disponibile in relazione agli intervalli di riferimento di un esame “comune” come il TSH può aiutare a comprendere le dimensioni e l'urgenza del problema. Soldin et al. hanno riassunto nel loro volume i risultati riportati da sei articoli ed abstract<sup>83</sup>:

- 1) Valori che scendevano da < 4.1 (1-12 mesi) a < 3.1 (13-18 anni) mU/L in 569 ospedalizzati e da < 4.0 (1-12 mesi) a < 3.0 (13-18 anni) mU/L in 524 ospedalizzate (divisi in classi di uno-cinque anni). I soggetti sono stati selezionati nell'area di Washington e gli autori hanno usato un analizzatore DELFIA ed un approccio basato sulla tecnica di Hoffmann.
- 2) Intervalli di 0.55-7.10 (1 mese -5 anni) e 0.37-6.00 (6-18 anni) mU/L in 95 ospedalizzati; 0.46-8.10 (1 mese-5 anni) e 0.36-5.80 (6-18 anni) mU/L in 95 ospedalizzate. I soggetti sono stati selezionati nell'area di Washington e gli autori hanno usato un analizzatore IMx ed un approccio basato sulla tecnica

di Hoffmann.

- 3) Intervalli di 0.80-7.52 (1 mese -5 anni) e 0.61-6.39 (6-18 anni) mU/L in 95 ospedalizzati; 0.70-8.55 (1 mese -5 anni)-0.60-6.18 (6-18 anni) mU/L in 95 ospedalizzate. I soggetti sono stati selezionati nell'area di Washington e gli autori hanno usato un analizzatore Immuno I ed un approccio basato sulla tecnica di Hoffmann.
- 4) Intervalli di 0.67-4.46 mU/L (< 2 anni) in 36; 0.40-3.20 (2-6 anni) in 149; 0.30-2.69 (7-13 anni) in 128 and 0.40- 1.90 mU/L (13-18 anni) in 123 ospedalizzati. Gli autori hanno usato un analizzatore ACS ed un approccio basato sulla tecnica di Hoffmann.

Soldin et al. riportano due ulteriori intervalli di riferimento: uno ottenuto con l'analizzatore Vitros Eci in un numero di soggetti non specificati di età compresa tra 6 mesi e 18 anni (0.5-4.5 mU/L) e un altro ottenuto confrontando i risultati ottenuti dall'analizzatore Dimension a dati della letteratura (0.67-5.97 nei maschi e 0.59-6.78 mU/L nelle femmine nell'intervallo di età 1 mese-5 anni; 0.52-5.08 nei maschi e 0.51-4.91 mU/L nelle femmine nell'intervallo di età 6-18 anni). La difficoltà di ottenere valori di riferimento è confermata da ulteriori studi recenti compiuti in popolazioni ed impiegando analizzatori e tecniche statistiche diverse che hanno prodotto risultati poco confrontabili.

Zurakowski et al. usando l'analizzatore DELFIA e tecniche indirette in quasi 6000 maschi e femmine (divisi in quattro classi da 5 anni) hanno ottenuto intervalli di riferimento che calavano da 0.7-6.0 mU/L (in 659 maschi) e 0.7-5.9 mU/L (in 523 femmine) nella classe 1-5 anni a 0.5-4.4 (in 223 maschi) e 0.5-3.9 (in 809 femmine) mU/L nella classe 16-20 anni<sup>86</sup>.

Elminger et al. hanno ottenuto con l'analizzatore Immulite, seguendo le raccomandazioni IFCC, degli intervalli di riferimento in calo da 0.63-4.12 a 0.52-2.36 mU/L in 393 maschi e 369 femmine divisi in classi di un anno di 40-80 soggetti selezionati in Germania<sup>87</sup>.

Hubner et al. usando l'analizzatore Centaur hanno calcolato intervalli di riferimento che calavano da 0.30-5.88 (< 1 anno) a 0.56-4.53 mU/L (15-18 anni) in 460 soggetti selezionati in aree diverse della Germania e divisi in classi di età di cinque anni di circa 100 soggetti<sup>88</sup>.

Un gruppo spagnolo usando l'analizzatore Centaur ha ottenuto intervalli di riferimento che calavano da 0.87-5.55 (7-8 mesi) a 0.66-4.66 mU/L in 371 soggetti in cui i maschi presentavano risultati in genere più elevati<sup>89</sup>.

Djemli et al. hanno riportato i seguenti intervalli di riferimento in campioni di plasma EDTA ottenuti in soggetti ospedalizzati usando l'analizzatore Access 2 e metodi non parametrici dopo trasformazione logaritmica: 1.0-5.7 mU/L in 27 femmine e 0.7-5.9 mU/L in 46 maschi di età compresa tra 1-24 mesi; 0.90-4.0 mU/L in 101 femmine e 1.00-3.7 mU/L in 106 maschi di 9-10 anni; 0.70-3.40 mU/L in 101 femmine e 0.80-3.9 mU/L in 100 maschi di 11-14 anni; 0.60-3.70

mU/L in 101 femmine e 0.70-2.8 mU/L in 100 maschi di 15-17 anni<sup>90</sup>.

Si può pertanto concludere che, anche nella definizione degli intervalli di riferimento di un esame comune come il TSH, l'omogeneità e l'affidabilità degli intervalli di riferimento sono molto limitate.

## Bibliografia

- Henderson J. Ernest Starling and "Hormones": an historical commentary. *J Endocrinol* 2005; 184:5-10.
- Tattersall R, Turner B. Brown-Séquard and his syndrome. *Lancet* 2000; 356:61-3.a.
- Wilson JD. The evolution of endocrinology. *Clin Endocrinol* 2005; 62:389-96.
- Hughes I. The blurring of the margins of endocrinology and its relevance to the paediatric endocrinologist. *Eur J Endocrinol* 2006; 155:S1-S2.
- Sawin CT. Maurice S Raben and the treatment of growth hormone deficit. *Endocrinologist* 2002; 12:73-6.
- Sawin CT. Classics in Endocrinology *Endocrinologist* 2002; 12:77-81.
- Agenzia Italiana del farmaco. Le note AIFA 2006-2007 per l'uso appropriato dei farmaci. [http://www.agenziafarmaco.it/aifa/servlet/wscs\\_render\\_attachment\\_by\\_id/111.90291.1168607405163.pdf?id=111.88204.1168596628882](http://www.agenziafarmaco.it/aifa/servlet/wscs_render_attachment_by_id/111.90291.1168607405163.pdf?id=111.88204.1168596628882) (Data ultima consultazione 30.03.2007)
- American Association of Clinical Endocrinologist AACE clinical practice guidelines for growth hormone use in adults and children- 2003. *Endocr Pract* 2003; 9:65-76.
- Cappa M, Loche S. Evaluation of growth disorders in the paediatric clinic. *J Endocrinol Invest* 2003;26:54-63.
- Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency: summary statement of the Growth Hormone Research Society Workshop on adult growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:379-81.
- Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: Summary statement of the GH research society. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3990-3.
- Dattani M, Preece M. Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis, and treatment. *Lancet* 2004; 363:1977-87.
- Sizonenko PC, Clayton PE, Cohen P, Hintz RL, Tanaka T, Laron Z. Diagnosis and management of growth hormone deficiency in childhood and adolescence. Part 1: diagnosis of growth hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res* 2001;11:137-65.
- Loche S, Bizzarri C, Maghnie M, Faedda A, Tziella C, Autelli M, et al. Results of early reevaluation of growth hormone secretion in short children with apparent growth hormone deficiency. *J Pediatr* 2002; 140:445-9.
- Lee MM. Clinical practice. Idiopathic short stature. *N Engl J Med* 2006; 354: 2576-82.
- Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 1998;19: 717-97.
- Wood P. Growth hormone: its measurement and the need for assay harmonization. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 471-82.
- Popii V, Bauman G. Laboratory measurement of growth hormone. *Clin Chim Acta* 2004; 350: 1-16.
- Bayle M, Chevenne D, Doussel B, Lahlou N, Le Bouc Y, Massart C, et al. Recommandations pour l'harmonisation des techniques de dosage sérique d'hormone de croissance. *Ann Biol Clin* 2004; 62:155-63.
- Bristow AF. International standards for growth hormone. *Horm Res* 1999; 51:7-12.
- Wieringa GE, Barth JH, Trainer PJ. Growth hormone assay standardization: a biased view. *Clin Endocrinol* 2004; 60:538-9.
- Trainer PJ, Barth JH, Sturgeon C, Wieringa GE. Consensus on the standardization of GH assays. *Eur J Endocrinol* 2006; 155:1-2.
- Sheppard MC. Growth hormone assay standardization: an important clinical advance. *Clin Endocrinol Clinical Endocrinology* 2007; 66:157-61.
- Tanaka T, Tachibana K, Shimatsu A, Katsumata N, Tsumishima T, Hizuka N et al. A nationwide attempt to standardize growth hormone assays. *Horm Res* 2005; 64:6-11.
- Ghigo E, Bellone J, Aimaretti G, Bellone S, Loche S, Cappa M, et al. Reliability of provocative tests to assess growth hormone secretory status. Study in 472 normally growing children. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3323-7.
- Gandrud LM, Wilson DM. Is growth hormone stimulation testing in children still appropriate? *Growth Horm IGF Res* 2004; 14:185-94.
- Badaru A, Wilson DM. Alternatives to growth hormone stimulation testing in children. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15:252-8.
- Rosenfeld R, Albertsson-Wikland K, Cassorla F, Frasier SD, Hasegawa Y, Hintz RI, et al. Diagnostic controversy: the diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1532-40.
- Strasburger CJ, Bidlingmaier M. How robust are laboratory measures of growth hormone status? *Horm Res* 2005; 64: 1-5.
- Attanasio R, Cozzi R, Dorizzi RM, Martinelli M. Manuale per la valutazione e l'inquadramento della patologia ipotalamo-ipofisaria. Verona: AME, ANIE, SIMEL; 2006.
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu J-L, Butler A. The Somatomedin Hypothesis: 2001. *Endocrine Reviews* 2001; 22:53-74.
- Le Roith D. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 1997; 336:633-40.
- Melmed S. Insulin-like growth factor I - a prototypic peripheral-paracrine hormone? *Endocrinology* 1999; 140: 3879-80.
- Le Roith D, Butler AA. Insulin-like Growth Factors in Pediatric Health and Disease *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4355-61.
- Laron Z. The essential role of IGF-I: lessons from the long-term study and treatment of children and adults with Laron syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4397-404.
- Teale JD, Marks V. The measurement of insulin-like growth factor I: clinical applications and significance. *Ann Clin Biochem* 1986; 23:413-24.
- Quarmby V, Quan C, Ling V, Compton P, Canova-Davis E. How much insulin-like growth factor I (IGF-I) circulates? Impact of standardization on IGF-I assay accuracy. *J*

- Clin Endocrinol Metab 1998; 84:4355-61.
38. Elmlinger MW, Kuhnel W, Weber MM, Ranke MB. Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 (IGFBP-3) Clin Chem Lab Med 2004; 42:654-64.
  39. Federico G, Street ME, Maghnie M, Caruso-Nicoletti M, Loche S, Bertelloni S. Assessment of serum IGF-I concentrations in the diagnosis of isolated childhood-onset GH deficiency: a proposal of the Italian Society for Pediatric Endocrinology and Diabetes (SIEDP/ISPED). J Endocrinol Invest 2006; 29:732-7.
  40. Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92:804-10.
  41. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. Arch Dis Child 1969; 44:291-303.
  42. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 2364-8.
  43. Parent A-S, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon J-P. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. Endocr Rev 2003; 24:668-93.
  44. Kaplowitz PB, Oberfield SE. Reexamination of the age limit for defining when puberty is precocious in girls in the United States: implications for evaluation and treatment. Drug and Therapeutics and Executive Committees of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Pediatrics 1999; 104:936-41.
  45. Bauer AJ, Francis GL, Poth M. Review of Precocious Puberty: Part III—Premature Thelarche and Premature Adrenarche. Variations of Normal? Endocrinologist 2001; 11:196-203.
  46. Styne DM. New aspects in the diagnosis and treatment of pubertal disorders. Pediatr Clin North Am 1997; 44: 505-29.
  47. Root AW. Precocious puberty. Endocr Rev 2000; 21:10-9.
  48. Herman-Giddens ME, Kaplowitz PB, Wasserman R. Navigating the recent articles on girls' puberty in pediatrics: what do we know and where do we go from here? Pediatrics 2004; 113:911-7.
  49. Auchus RJ. The riddle of adrenarche. Endocrinologist 2004; 14:329-36.
  50. Elders MJ, Scott CR, Frindik, Kemp SF. Clinical workup for precocious puberty. Lancet 1997; 350:457-8.
  51. Brito VN, Batista MC, Borges MF, Latronico AC, Kohek MBE, Thirone ACP, et al. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:3539-44.
  52. Rosen DS. Delayed puberty. Endocr Rev 2001; 22: 309-15.
  53. Rosenfield RL. Diagnosis and management of delayed puberty. J Clin Endocrinol Metab 1990; 70:559-62.
  54. McKeever MO. Delayed puberty. Endocr Rev 2000; 21: 250-1.
  55. Sedlmeyer IL, Palmert MR. Delayed puberty: analysis of a large case series from an academic center. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:1613-20.
  56. Traggiai C, Stanhope R. Delayed puberty. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2002; 16:139-51.
  57. Rosenfield RL. Identifying children at risk for polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 787-96.
  58. Bauman EE, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome in adolescence. Endocrinologist 2002; 12:333-48.
  59. Franks S. Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2002; 16: 263-72.
  60. Buggs C, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome in adolescence. Endocrinol Metab Clin N Am 2005; 34:677-705.
  61. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92:405-13.
  62. Giavarina G. Gli intervalli di riferimento, RIMeL/IJLaM 2006; 2:50-6.
  63. Friedberg RC, Souers R, Wagar EA, Stankovic AK, Valenstein PN. The origin of reference intervals. A College of American Pathologists Q-Probes study of "normal ranges" used in 163 clinical laboratories. Arch Pathol Lab Med 2007; 131:348-57.
  64. <http://www.bioscience.org/atlas/clinical/chemist/pediatri.htm> (data di consultazione: 30.03.2007).
  65. Kratz A, Ferraro M, Sluss PM, Lewandrowski KB. Laboratory reference values. N Engl J Med 2004; 351: 1548-63.
  66. Thomas L. Clinical laboratory diagnostics. Frankfurt: TH-Books; 1998.
  67. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. St Louis: Elsevier's Saunders; 2006.
  68. <http://www.aruplab.com/guides/ug/tests> (data di consultazione: 30.03.2007).
  69. Roche Diagnostics. Reference Intervals for children and adults. Elecsys thyroid tests, 1204-2.5CD, 2004.
  70. Roche Diagnostics. Elecsys Estradiol, 1 845 730. Mannheim, 2000.
  71. Roche Diagnostics. Elecsys LH, 1 845 527. Mannheim, 2003.
  72. Roche Diagnostics. Elecsys FSH, 11845 578. Mannheim, 2002.
  73. Roche Diagnostics. Elecsys Testosterone, 1845 779. Mannheim, 2000.
  74. Kuhnel W. Immulite and Immulite 2000. Reference range compendium ZB197. Los Angeles DPC.
  75. Soldin OP, Hoffman EG, Waring MA, Soldin SJ. Pediatric reference intervals for FSH, LH, estradiol, T3, free T3, cortisol, and growth hormone on the DPC IMMULITE 1000. Clin Chim Acta 2005; 355:205-10.
  76. Elmlinger MW, Kühnel W, Michael B, Ranke MB. reference ranges for serum concentrations of lutropin (LH), follitropin (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), cortisol and ferritin in neonates, children and young adults. Clin Chem Lab Med 2002; 40:1151-60.
  77. Advia Centaur. Estradiolo-6 III (E2-6III).1478360 Rev.D. Tarrytown 2005.
  78. Advia Centaur. Testosterone.111754 Rev.H. Tarrytown 2003.
  79. Advia Centaur. FSH 111744 Rev.G. Tarrytown 2005.

80. Advia Centaur. LH 111739 Rev.J. Tarrytown 2005.
81. Pryce SD. Level of haemoglobin in whole blood and red blood-cells, and proposed convention for defining normality. *Lancet* 1960; 2:333-6.
82. Hoffmann RG. Statistics in the practice of medicine. *J Am Med Assoc* 1963; 185:864-73.
83. Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC, editors. Pediatric reference ranges. 4<sup>th</sup> ed. Washington: AACCC Press; 2003.
84. CALIPER investigators. Pediatric reference intervals: critical gap analysis and establishment of a national initiative. *Clin Biochem* 2006; 39:559-60.
85. Delvin EE, Laxmi Grey V, Vergee Z. for the CALIPER Working Group. Gap analysis of pediatric reference intervals related to thyroid hormones and the growth hormone-insulin growth factor axis. *Clin Biochem* 2006; 39: 588-94.
86. Zurakowski D, Di Canzio J, Majzoub JA. Pediatric reference intervals for serum thyroxine, triiodothyronine, thyrotropin, and free thyroxine. *Clin Chem* 1999; 45: 1087-91.
87. Elmlinger MW, Kühnel W, Lambrecht H-G, Ranke MB. Reference intervals from birth to adulthood for serum thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), free T3, free T4, thyroxine binding globulin (TBG) and thyrotropin (TSH). *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:973-9.
88. Hubner U, Englisch C, Werkmann H et al. Continuous age-dependent reference ranges for thyroid hormones in neonates, infants, children and adolescents established using the ADVIA® Centaur™ Analyzer. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:1040-7.
89. García Cuartero B, García La calle C, Jiménez Lobo C et al. Valores de tirotrópina, triyodotironina libre y tiroxina libre en niños y adolescentes en la comunidad autónoma de Madrid mediante quimioluminiscencia. *An Pediatr* 2003; 58:222-7.
90. Djemli A, Van Vliet G, Belgoudi J, Lambert M, Delvin EE. Reference intervals for free thyroxine, total triiodothyronine, thyrotropin and thyroglobulin for Quebec newborns, children and teenagers. *Clin Biochem* 2004; 37:328-30.