

## Sviluppo e validazione di un metodo analitico per la misurazione in neonati dell'ormone della crescita in campioni eluiti da carte filtro

Chiara Vantaggiato<sup>1</sup>, Chiara Orsenigo<sup>1</sup>, Claudia Giavoli<sup>2,3</sup>, Maura Arosio<sup>2,3</sup>, Federico Giacchetti<sup>2</sup>, Giulia Rodari<sup>2,3</sup>, Eriselda Profka<sup>2</sup>, Adriana Di Modugno<sup>1</sup>, Filomena Napolitano<sup>1</sup>, Ferruccio Ceriotti<sup>1</sup>, Matteo Vidali<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UOC Patologia Clinica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

<sup>2</sup> UOC Endocrinologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano, Milano

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso SIBioC, 11-12 ottobre 2021 Virtual Edition, ricevendo il Premio Spandrio*

### ABSTRACT

#### Development and validation of a method for the measurement of growth hormone in newborns on dried blood spots.

Introduction: severe deficiency of Growth Hormone (GHD) of the newborn is a rare but potentially life-threatening disease. GH can be measured during the first week of life when levels are physiologically higher. Aim of the study was to validate a method to measure GH in newborns from dried blood spots (DBS) for reference interval estimation.

Methods: whole EDTA-blood and serum were collected from patients attending the Endocrinology Unit. 50 µL of EDTA-blood was spotted onto Guthrie cards (LTA Srl) which were air dried at room temperature (RT) for 4 hours and processed or stored at -20°C up to 8 months. Three disks (5.5 mm) were punched out into a 2 mL polypropylene tube and 250 µL of PBS1x were added. Samples were incubated at RT for 16 hours and then centrifuged at 12 500 rpm for 1 min. GH in supernatants or undiluted sera was determined by Immulite 2000 (Siemens Healthineers) and a calibration curve was built.

Results: linearity was verified ( $R^2 > 0.99$ ) up to 50 µg/L. At 1 µg/L, considered the Limit of Quantification (LOQ), CV% resulted to be 11%. Repeatability at 8 concentrations (from 1.5 to 50 µg/L) ranged from 2.4% to 11.1%. At 7 µg/L, the cut-off previously reported by literature for GHD, CV% was 3.7%. Within-laboratory imprecision, evaluated in a period of 8 months at two different concentrations (3.4 µg/L and 10.1 µg/L) was 13% and 5.9%, respectively.

Conclusions. The new method displayed good analytical performances, suggesting it can be used to measure GH in newborns using DBS for reference interval estimation.

**Keyword:** *ormone della crescita, neonati, dried blood spot*

### INTRODUZIONE

A differenza dell'età evolutiva (>18 mesi), dove l'asse GH-IGF-1 (Growth Hormone - Insulin-like Growth Factor-I; Ormone della crescita - Fattore di crescita insulino-simile I) gioca un ruolo primario nel promuovere l'accrescimento, durante la vita intrauterina e in quella postnatale, la crescita è sotto il complesso controllo di fattori genetici, nutrizionali, ormonali (ormoni tiroidei, insulina, IGF-I, IGF-II) e ambientali (1). Tuttavia, il normale riscontro di livelli di GH più elevati nel feto e nel neonato (ipersomatotropismo neonatale), rispetto a quelli osservati nell'infanzia e nell'età adulta, suggerisce un possibile ruolo alternativo metabolico del GH (1,2), in

particolare nella regolazione endocrina dell'omeostasi glucidica, con azione anti-insulina e lipolitica (3,4).

Il deficit congenito di ormone della crescita [Growth Hormone Deficiency, (GHD)] rappresenta una condizione estremamente rara, con un'incidenza stimata di 1 caso ogni 4 000-10 000 nuovi nati vivi; tuttavia, esso costituisce il deficit ipofisario di più frequente riscontro nell'ambito dell'ipopituitarismo congenito (5). Sebbene la maggior parte dei casi siano sporadici, generalmente associati a insulti ambientali e anomalie dello sviluppo embrionico-fetale, fino al 30% dei neonati con un vero GHD isolato presentano forme familiari, suggerendo un'etiologia genetica (6).

Corrispondenza a: Matteo Vidali UOC Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Via Francesco Sforza 28 20122 Milano, Italy; Email: [matteo.vidali@policlinico.mi.it](mailto:matteo.vidali@policlinico.mi.it)

Ricevuto: 31.07.2022

Rivisto: 31.08.2022

Accettato: 13.09.2022

Publicato online: 12.10.2022

DOI: 10.19186/BC\_2022.063

Le forme di GHD su base genetica possono presentarsi con deficit isolato del solo ormone GH (GHD isolato o iGHD) o con il contemporaneo deficit di più tropine ipofisarie [deficit multiplo di ormoni ipofisari; Multiple Pituitary Hormone Deficiency (MPHD)]. I geni più comunemente implicati nell'eziologia genetica dell'iGHD sono quelli che codificano per il recettore dell'ormone di rilascio della somatotropina, [Growth hormone releasing hormone, (GHRH), (gene *GHRHR*) e per il GH stesso (gene *GH1*)] (6). Tra le forme di iGHD su base genetica si riconoscono classicamente quattro differenti sottotipi: tipo IA, la forma più severa di iGHD a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata dalla completa assenza di GH, severa compromissione della crescita e frequente sviluppo di anticorpi anti-GH ricombinante durante la terapia sostitutiva; tipo IIB, la forma più frequente, a trasmissione autosomica recessiva, con minore compromissione staturale e con una residua produzione endogena di GH; tipo II e tipo III, a trasmissione, rispettivamente, autosomica dominante e recessiva associata al cromosoma X (6). Nell'ambito delle forme MPHD i geni coinvolti sono numerosi e i fenotipi risultanti estremamente variabili.

Nei neonati con GHD si osserva frequentemente un'ipoglicemia ricorrente con presentazione variabile fino, in alcuni casi, all'emergenza neonatale (4,7). A tal riguardo, la diagnosi precoce di GHD ed il suo tempestivo trattamento sono fondamentali al fine di prevenire le ipoglicemie ricorrenti e le complicanze neurologiche ad esse correlate, nonché per diagnosticare eventuali altri possibili deficit ipofisari associati (4).

Alla diagnosi di GHD possono concorrere elementi derivati dalla presentazione clinica, dalla valutazione integrata di vari parametri auxologici, dalla valutazione dinamica della secrezione di GH mediante test di stimolo, dalla misurazione dei livelli di GH e IGF-1, dall'imaging di risonanza magnetica (RMN) ipotalamo-ipofisario e dall'analisi genetica. Tuttavia, questi elementi giocano un ruolo differente a seconda dell'età del soggetto considerato. La valutazione random delle concentrazioni sieriche di GH non ha alcun valore clinico dopo i due anni di vita, in quanto esso è fisiologicamente secreto in modo pulsatile, con picchi secretori episodici, anche correlati all'attività fisica o ai pasti. Nel neonato, invece, i livelli di GH risultano costantemente elevati e misurabili nella prima settimana di vita, con rapida riduzione nelle settimane successive (8). Nel periodo neonatale i valori di IGF-1 non sono indicatori attendibili di un eventuale deficit di GH, in quanto essi risultano fisiologicamente molto bassi, con il limite inferiore dell'intervallo di riferimento vicino al limite di sensibilità dei metodi analitici (9). Infine, i test di stimolo sono controindicati in soggetti <1 anno di vita (5), sia a causa di difficoltà tecniche che per motivi di sicurezza.

La recente Consensus Conference del 2019 della Growth Hormone Research Society ha proposto, per la diagnosi di GHD neonatale, un valore soglia per il GH random <7 µg/L nella prima settimana di vita in neonati con alta probabilità pretest di GHD, definita dalla presenza di eventi di ipoglicemia, iperbilirubinemia persistente e/o difetti della linea mediana evidenziati all'RMN encefalo

(10). È interessante notare che tale valore decisionale è derivato unicamente dagli studi di Binder et al. (4,11,12), che per la determinazione dell'intervallo di riferimento del GH hanno misurato la concentrazione di GH in campioni eluiti da carta-filtro di Guthrie (Dried Blood Spots o DBS) utilizzando un saggio ELISA con GH ricombinante, originariamente sviluppato da Langkamp et al. (13).

Scopo di questo lavoro, su richiesta e in collaborazione con l'Unità Complessa di Endocrinologia del Policlinico di Milano, è stato quello di sviluppare e validare un metodo analitico, alternativo a quello utilizzato da Binder et al., per la misurazione dei livelli di GH su DBS, al fine di verificare successivamente il valore decisionale implementato a livello internazionale per la diagnosi di GHD neonatale. In particolare, anche in considerazione dell'elevato numero di campioni su DBS di neonati e dei relativi costi, il nuovo metodo era mirato a prevedere una fase preparativa di estrazione semplice e rapida, un principio analitico differente da quello immunoenzimatico utilizzato da Binder et al., l'utilizzo di strumenti già presenti in Laboratorio caratterizzati da una buona automazione, utilizzati routinariamente, sottoposti a verifiche esterne di qualità e largamente diffusi in ambito ospedaliero (quest'ultimo aspetto importante nell'ottica di ottenere un valore soglia condivisibile e applicabile su larga scala).

## METODI

### Materiali

Per questo studio di validazione sono state utilizzate aliquote residue di campioni di sangue intero (anticoagulante K<sub>3</sub>EDTA), con richiesta di emocromo, prelevati da pazienti adulti afferenti all'Unità Operativa di Endocrinologia della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano. Il campione per l'esecuzione dell'emocromo era sempre accompagnato da altri campioni per l'esecuzione di altri esami, richiesti per la diagnosi clinica del paziente o per monitoraggio, tra cui la misurazione di GH su siero. L'unico criterio di selezione applicato è stato quello della disponibilità di aliquote residue sia di siero che di sangue intero. In questo primo lavoro di validazione del metodo non sono stati inclusi campioni reali di neonato in DBS ma unicamente carte filtro preparate appositamente come descritto nei paragrafi successivi. Complessivamente, per la preparazione di tutti i campioni (calibratori, controlli, replicati sperimentali) necessari per il disegno dello studio di validazione e le successive curve di calibrazione utili all'analisi dei campioni dei neonati, sono stati arruolati 30 soggetti adulti. Inoltre, il progetto presentato al Comitato etico per il calcolo dell'intervallo di riferimento del GH prevede l'analisi di circa 1 000 campioni di DBS di neonati.

### Preparazione e analisi dei campioni

50 µL di sangue intero di ogni campione (5 calibratori, 2 controlli, e campioni usati per la validazione) sono stati depositati per caduta su carta filtro di Guthrie (LTA srl, Milano, Italia), in spazi circolari di diametro pari a 13 mm. Le carte filtro sono state lasciate ad essiccare a

temperatura ambiente (TA) per 4 ore e successivamente processate o conservate a -20 °C fino al momento dell'utilizzo. Al contrario dei campioni su carta filtro, preparati appositamente per l'esperimento di validazione, la stima dell'intervallo di riferimento del GH di neonati è stata condotta analizzando carte filtro residue dopo lo screening neonatale.

La procedura per l'analisi dei campioni depositati su carta filtro include le seguenti fasi:

- foratura della carta filtro: da ogni spazio circolare di diametro di 13 mm sono ottenuti, tramite punzonatrice, 3 dischi di diametro di 5,5 mm;

- estrazione dei campioni: i dischi sono inseriti in provette di polipropilene da 2 mL e diluiti in 250 µL di tampone fosfato (PBS 1x). I campioni sono incubati a TA con rotore orbitale per 16 ore. Al termine dell'incubazione, i campioni sono centrifugati a 12 500 giri/minuto per 1 minuto;

- analisi dei campioni: il GH nel soprannatante è misurato con strumentazione Immulite 2000 (Siemens Healthineers), con standard calibrati secondo WHO IS 98/574. Il kit utilizzato è un saggio immunometrico chemiluminescente a 2 siti in fase solida, con limite di sensibilità pari a 0,01 ng/mL.

**Calcolo della concentrazione di GH**

Il calcolo della concentrazione finale di GH prevede le seguenti fasi:

*Calibrazione del GH DBS al valore del GH su siero*

- per 5 soggetti con valori crescenti di GH sono stati ottenuti sia il siero che il sangue intero in EDTA depositato su carta da filtro (le aliquote di siero e di DBS sono state conservate a -20 °C). Sia i sieri che i DBS dei 5 calibratori sono misurati con Immulite. Il valore ottenuto sul DBS viene normalizzato per un ematocrito (Ht) di 0,45, utilizzando la seguente formula:

$$GH\ corretto = GH / (1 - Ht) \times (1 - 0,45)$$

dove GH è il dato di un calibratore su DBS ottenuto con la lettura di Immulite e Ht il valore dell'ematocrito del soggetto a cui appartiene il campione di sangue intero utilizzato per quel particolare calibratore;

- calcolo dell'equazione di regressione lineare (Y=Mx+Q), considerando come ascisse il valore di GH dei singoli soggetti, misurato su siero, e come ordinate il valore di GH dei singoli soggetti ottenuto sul soprannatante e normalizzato per Ht secondo la formula precedente. Tale modello permette di calcolare, dal valore di GH su carta filtro, l'equivalente su siero.

*Calcolo della concentrazione dei campioni (controlli e soggetti)*

Le concentrazioni dei soprannatanti sono trasformate in concentrazioni sieriche tramite la curva di regressione (tale valore è però riferito ad un ematocrito teorico di 0,45, a causa della normalizzazione della curva di regressione). Infine, il valore di GH di ogni campione (GH predetto) viene ricalcolato tenendo conto del proprio Ht

utilizzando la formula:

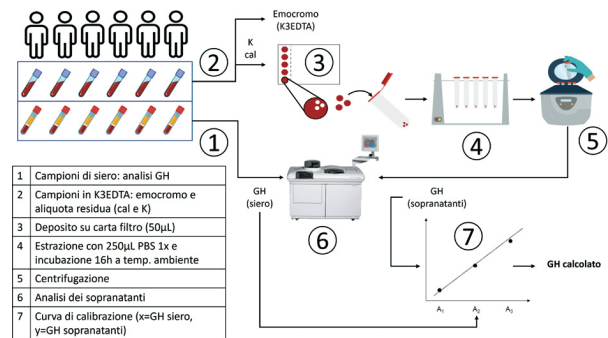
$$GH\ finale = GH\ predetto / (1 - Ht) \times (1 - 0,45)$$

Per i controlli e i campioni di soggetti utilizzati nella validazione l'Ht è noto, perché ogni soggetto aveva eseguito contestualmente un emocromo; per i neonati si utilizzerà un ematocrito ipotizzato di 0,55, come fatto in precedenza da Langkamp et al. (13).

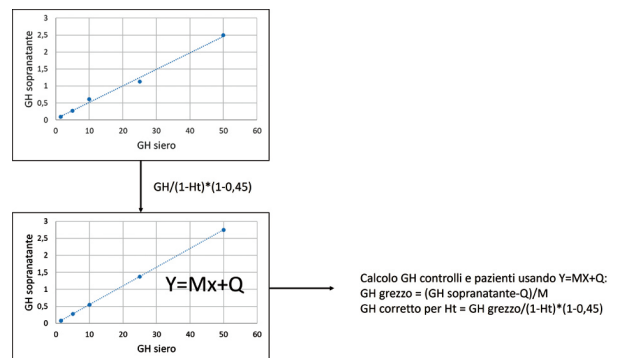
*Validazione della seduta*

I valori dei controlli (2 livelli), corretti per Ht, sono confrontati con i valori attesi delle rispettive concentrazioni su siero. I valori dei controlli consentono inoltre di confrontare una seduta con le successive e le precedenti.

Le figure 1 e 2 illustrano il processo analitico completo e il calcolo delle concentrazioni.



**Figura 1**  
Schema del processo analitico per l'analisi dell'ormone della crescita (GH) da carte filtro. La tabella inclusa in figura illustra le varie fasi del processo. Cal, calibratori; K, controlli.



**Figura 2**  
Schema del calcolo (regressione e normalizzazione) delle concentrazioni finali dell'ormone della crescita (GH). Ht, ematocrito; M, coefficiente angolare della retta di regressione; Q, intercetta della retta di regressione.

**Validazione del metodo**

La scelta dei parametri utilizzati per il processo di validazione ha tenuto conto dello specifico scopo per cui il metodo è stato creato, cioè la stima dell'intervallo di riferimento del GH su carte filtro di neonati. I lavori precedenti di Langkamp e Binder (11-13) hanno

evidenziato un limite inferiore per i neonati sani pari a 7 µg/L. A tal fine si è scelto di non determinare il limite di sensibilità o LOD e di verificare come limite di quantificazione (LOQ) una concentrazione di GH pari a 1 µg/L (5 replicati).

L'imprecisione è stata valutata in diversi modi:

- la ripetibilità stretta è stata valutata analizzando 5 replicati indipendenti (5 campioni diversi per preparativa e analisi) a 8 concentrazioni diverse, tra 1,5 µg/L e 50 µg/L;

- l'imprecisione a livello del valore decisionale ipotizzato è stata valutata analizzando 10 replicati indipendenti di un campione con concentrazione sierica attesa di 7 µg/L;

- la ripetibilità intermedia è stata valutata utilizzando i dati dei controlli e dei calibratori di 33 sedute analitiche, per un periodo di 8 mesi.

La linearità è stata valutata con un disegno 3 replicati indipendenti x 8 concentrazioni (da 1,5 a 50 µg/L).

Inoltre, sono state valutate l'interferenza da emolisi e la stabilità dell'analita nelle carte filtro a -20 °C. Poiché l'estrazione di un campione di sangue intero da carta filtro con tampone fosfato comporta l'estrazione anche del contenuto dei globuli rossi lisati e quindi di emoglobina, è stato necessario valutare l'interferenza da emoglobina sul metodo di Immulite, anche se dichiarata dal produttore come non significativa. L'interferenza dovuta ad emolisi post-estrazione è stata valutata aggiungendo estratti di campioni, con concentrazione attesa di GH indosabile, a campioni di siero con concentrazioni note di GH (a 2 diverse concentrazioni attese di GH, a 3,2 µg/L e 9,0 µg/L). L'interferenza è stata valutata sulla base del recupero:  $(\text{atteso-osservato})/\text{atteso} \times 100\%$ .

La stabilità è stata valutata a due diverse concentrazioni valutando il recupero dell'analita in carte filtro conservate a -20 °C fino a 2 mesi. La valutazione della stabilità è stata successivamente estesa valutando il recupero dei campioni utilizzati come controlli e calibratori fino a 8 mesi.

Nella fase di validazione sono state valutate, inoltre, diverse condizioni di estrazione, sia come tampone di estrazione (PBS 1x *versus* PBS+detergente Tween), sia come tempo di estrazione (2 ore *versus* 16 ore). Le condizioni sono state valutate come recupero dell'analita a diverse concentrazioni.

### Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software statistico R v. 4.1.2. Le variabili quantitative sono state descritte come media, deviazione standard e coefficiente di variazione % (CV%). L'analisi di regressione è stata condotta tramite regressione lineare.

### RISULTATI

Non sono state osservate differenze tra i campioni estratti mediante PBS più detergente Tween o solo PBS (a 50 µg/L, differenze <5%). L'estrazione è risultata maggiore, anche se con differenze non importanti, per i campioni incubati 16 ore rispetto a quelli incubati per

2 ore: a 2,9, 7,7 e 50 µg/L, la differenza % risultava del 4,2%, 5,9%, 12,6%. Per tale motivo nel protocollo definitivo, presentato in questo lavoro, è stato utilizzato il solo PBS 1x come liquido di estrazione e 16 ore come tempo di estrazione.

L'analisi di regressione ha stimato una linearità fino a 50 µg/L ( $R^2 > 0,99$ ). Non sono state riscontrate differenze significative tra i campioni conservati a -20 °C fino a 2 mesi ed i campioni sottoposti ad immediata misurazione per tutte le concentrazioni analizzate (recupero >90%). Tale stabilità è stata confermata anche dai dati dei calibratori e controlli ottenuti da carte filtro conservate fino a 8 mesi. Inoltre, nessuna interferenza significativa è stata osservata per la presenza di emoglobina libera nei campioni estratti (recupero >99% alle concentrazioni valutate).

L'imprecisione a 1 µg/L (LOQ) è risultata pari a 11,1%. Alle 8 concentrazioni valutate tra 1,5 e 50 µg/L, la ripetibilità stretta è risultata pari a 11,1%, 2,4%, 3,5%, 3,5%, 6,1%, 2,9%, 5,2%, 2,7% rispettivamente. A tali concentrazioni il recupero è risultato sempre >90%. Ulteriori valutazioni dell'imprecisione alla concentrazione teorica del valore decisionale per il GH dei neonati (circa 7 µg/L) hanno confermato le osservazioni precedenti (CV%= 3,7%), suggerendo un buon livello di imprecisione. Infine, la valutazione della ripetibilità intermedia, valutata in un periodo di 8 mesi, per un totale di 33 sedute analitiche, è risultata uguale a 13% e 5,9%, rispettivamente, per il controllo basso (3,4 µg/L) e alto (10,1 µg/L). Il coefficiente di variazione calcolato sui 33 coefficienti della curva di regressione (pendenza) è risultato pari a 7,2%. Infine, il bias percentuale medio calcolato confrontando il valore teorico sierico dei controlli con quello ottenuto dal metodo, secondo la formula  $(\text{atteso-calcolato})/\text{atteso} \times 100\%$ , è risultato rispettivamente uguale a 6,9% (3,4 µg/L) e -1,8% (10,1 µg/L). Le prestazioni del metodo sono riassunte in Tabella 1.

### DISCUSSIONE

In questo lavoro presentiamo i dati di validazione di un nuovo metodo analitico su carta filtro, sviluppato su richiesta dell'Unità operativa di Endocrinologia, con il fine di stimare l'intervallo di riferimento del GH in neonati sani. Il progetto prevede la determinazione del GH su campioni eluiti da carte filtro residue dopo screening metabolico. Attualmente il valore decisionale utilizzato per la diagnosi di GHD neonatale, riconfermato nella più recente Consensus Conference (2019) della Growth Hormone Research Society, eseguito entro la prima settimana di vita su un campione random, è pari a 7 µg/L. Tale valore è basato sui lavori originali di Binder e Langkamp (4,11-13), che risalgono a più di 10 anni fa e che sono stati ottenuti utilizzando un kit ELISA commerciale ad alta sensibilità con GH ricombinante. Attualmente, a nostra conoscenza, questo è l'unico metodo descritto in letteratura per l'analisi di GH su carte filtro. È necessario ricordare che in caso di forte sospetto clinico di GHD, che include la presenza di eventi di ipoglicemia, e/o iperbilirubinemia persistente e/o difetti della linea mediana evidenziati all'RMN encefalo, la determinazione del GH neonatale viene eseguita

**Tabella 1**

Prestazioni del metodo analitico.

Parametro	Disegno	Prestazioni
LOQ	5 replicati a 1 µg/L	CV 11,1%
Imprecisione		
Ripetibilità stretta	5 replicati a 8 concentrazioni (1,5-50 µg/L) 10 replicati a 7 µg/L	Min CV 2,4% Max CV 11,1% CV 3,7%
Ripetibilità intermedia	2 controlli per 8 mesi (33 sedute analitiche)	CV 13% (a 3,4 µg/L) CV 5,9% (a 10,1 µg/L)
Linearità	3 replicati a 8 concentrazioni (1,5-50 µg/L)	Fino a 50 µg/L R <sup>2</sup> >0,99
Interferenza (emolisi)	2 concentrazioni (3,2 µg/L e 9,0 µg/L)	Recupero>99%
Stabilità (-20 °C)	2 concentrazioni (3,2 µg/L e 9,0 µg/L) a 2 e a 8 mesi	Recupero>90%

LOQ, *Limite di quantificazione*; CV, *coefficiente di variazione*.

routinariamente in un campione di siero. Tuttavia, al pari di Langkamp e Binder, la stima dell'intervallo di riferimento in neonati sani richiede, per ovvie ragioni, l'utilizzo di carte filtro residue e l'ipotesi di un ematocrito pari al 0,55(4,11-13).

Con una prima fase di ottimizzazione del metodo, valutando il recupero dell'analita, sono state definite le condizioni migliori di reazione, sia per il tampone (PBS 1x) che per il tempo di estrazione (16 ore). In accordo con le considerazioni fatte sopra, i dati evidenziano che il metodo sviluppato è idoneo per lo scopo previsto, sia in termini di esattezza (valutata come bias%), ripetibilità stretta e ripetibilità intermedia. Queste prestazioni sono state verificate a 8 concentrazioni differenti e, in particolare, in corrispondenza del valore decisionale di 7 µg/L descritto da Binder. È importante, inoltre, sottolineare che lo studio di validazione è stato esteso per un periodo complessivo di 8 mesi, il che suggerisce che le stime ottenute includono il contributo di eventuali diverse fonti di variabilità.

Il metodo è risultato lineare fino a 50 µg/L (massima concentrazione testata). Per valori >50 µg/L è necessario diluire il campione o indicare il risultato come >50 µg/L. È, tuttavia, da sottolineare il fatto che, ai fini della stima dell'intervallo di riferimento, come singolo limite di positività nell'intorno di 7 µg/L, valori >50 µg/L possono non essere diluiti e, invece, essere assimilati a valori uguali a 50 µg/L, in caso di utilizzo del metodo non parametrico. Relativamente alla stabilità e alla conservazione delle carte filtro, i nostri dati hanno evidenziato una sostanziale stabilità delle carte filtro conservate almeno fino a 8 mesi. Questa osservazione è in disaccordo con quanto pubblicato da

Binder et al (12), che ha mostrato una diminuzione lineare del 30% nel primo anno di conservazione. Tuttavia, le due situazioni non sono confrontabili, in quanto la temperatura di conservazione da noi utilizzata (-20 °C) era inferiore a quella di Binder (6 °C) (12).

Il nostro metodo presenta la particolarità di tradurre una concentrazione misurata su carta filtro nella corrispondente concentrazione sierica, tramite una curva di calibrazione, dove in ascissa è posta la concentrazione sierica e in ordinata la concentrazione del campione da carta filtro. I calibratori utilizzati provengono da aliquote residue di campioni sottoposti a emocromo; dello stesso soggetto, inoltre, è conosciuto il valore contestuale di GH misurato direttamente su siero. La conoscenza del valore di GH atteso, misurato su siero, e dell'Ht del soggetto, consente di ottenere una curva di calibrazione normalizzata per un Ht teorico di 0,45, con la quale calcolare il dato dei neonati. Come riportato nella sezione metodi, il valore ottenuto sui neonati viene ulteriormente corretto per un Ht teorico dei neonati pari al 0,55, come riportato da Binder e Langkamp. (4,11-13). La capacità del metodo di tradurre correttamente la concentrazione da carta filtro a siero è suggerita dai bassi valori di bias degli 8 mesi di validazione estesa (<7%). L'aver utilizzato una piattaforma analitica ampiamente diffusa nei laboratori, come Immulite, rappresenta un vantaggio in quanto, in caso di cambio strumentazione/produttore o termine della produzione della linea analitica, uno studio di comparazione dei metodi consentirebbe facilmente di ricalcolare eventualmente il valore decisionale.

In conclusione, il nuovo metodo presenta una semplice fase preparativa e ha mostrato prestazioni

idonee allo scopo per cui è stato progettato.

## FONDI

Piano Sostegno alla Ricerca 2021, Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano, Italia

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ogilvy-Stuart AL, Hands SJ, Adcock CJ, et al. Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-1, growth hormone, and feeding in the newborn. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3550-7.
2. Adrian TE, Lucas A, Bloom SR, et al. Growth hormone response to feeding in term and preterm neonates. *Acta Paediatr Scand* 1983;72:251-4.
3. Fowelin J, Attvall S, von Schenck H, et al. Characterization of the insulin-antagonistic effect of growth hormone in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 1995;12:990-6.
4. Binder G, Weber K, Rieflin N, et al. Diagnosis of severe growth hormone deficiency in the newborn. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2020;93:305-11.
5. Bosch I Ara L, Katugampola H, Dattani MT. Congenital Hypopituitarism During the Neonatal Period: Epidemiology, Pathogenesis, Therapeutic Options, and Outcome. *Front Pediatr* 2021;8.
6. Mullis PE. Genetic control of growth. *Eur J Endocrinol*. 2005;152:11-31.
7. Mehta A, Hindmarsh PC, Stanhope RG, et al. The role of growth hormone in determining birth size and early postnatal growth, using congenital growth hormone deficiency (GHD) as a model. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:223-31.
8. Ogilvy-Stuart AL. Growth hormone deficiency (GHD) from birth to 2 years of age: diagnostic specifics of GHD during the early phase of life. *Horm Res* 2003;60:2-9.
9. Jensen RB, Jeppesen KA, Vielwerth S, et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 as diagnostic markers of growth hormone deficiency in infancy. *Horm Res* 2005;63:15-21.
10. Collett-Solberg PF, Ambler G, Backeljauw PF, et al. Diagnosis, Genetics, and Therapy of Short Stature in Children: A Growth Hormone Research Society International Perspective. *Horm Res Paediatr* 2019;92:1-14.
11. Binder G, Weidenkeller M, Blumenstock G, et al. Rational approach to the diagnosis of severe growth hormone deficiency in the newborn. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2219-26.
12. Binder G, Hettmann S, Weber K, et al. Analysis of the GH content within archived dried blood spots of newborn screening cards from children diagnosed with growth hormone deficiency after the neonatal period. *Growth Horm IGF Res* 2011;21:314-7.
13. Langkamp M, Weber K, Ranke MB. Human growth hormone measurement by means of a sensitive ELISA of whole blood spots on filter paper. *Growth Horm IGF Res* 2008;18:526-32.