

Factores a tener en cuenta en la interpretación de los resultados de la concentración sérica del factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGF-1)

Factors to manage for interpreting insulin-like growth factor 1 (IGF-1) serum levels

Maria Luisa Granada Ybern¹, Laura Audí Parera², Alba Leis Sestayo¹, Rocío Alfayate Guerra³, Ángeles Aniel Quiroga⁴, Elías Álvarez García⁵, Myriam Ben Abdelhanin⁶, Eugenio Berlanga Escalera⁷, Gregori Casals Mercadal⁸, Roser Ferrer Costa⁹, Concepción García Lacalle¹⁰, Nieves López Lazareno¹¹, Raúl Rigo Bonnin¹², María Eugenia Torregrosa Quesada¹³, Comisión de Hormonas de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular

¹Servicio de Bioquímica. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona, Barcelona (España)

²Unidad Endocrinología Pediátrica. CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER). Barcelona (España)

³Laboratorio de Hormonas. Hospital General Universitario de Alicante. Alicante (España)

⁴Laboratorio de Hormonas. Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario de Cruces. Bilbao (España)

⁵Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Xeral Complejo Hospitalario Universitario de Vigo. Pontevedra (España)

⁶Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario La Paz. Madrid (España)

⁷Servicio de Bioquímica. UDIAT-Centre Diagnòstic. Corporació Sanitària Parc Taulí. Sabadell, Barcelona (España)

⁸Servicio de Bioquímica. Hospital Clínic. Barcelona (España)

⁹Servicio de Bioquímica. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona (España)

¹⁰Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Severo Ochoa. Leganés, Madrid (España)

¹¹Servicio de Bioquímica. Laboratorio de Hormonas y Biomarcadores. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid (España)

¹²Área de Bioquímica Especial. Hospital Universitari de Bellvitge. Barcelona (España)

¹³Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Marina Baixa. Villajoyosa, Alicante

Introducción

El diagnóstico bioquímico de los trastornos del eje somatotropo se realiza mediante la medición de la concentración en el suero de las principales hormonas de este eje: la somatotropina o hormona de crecimiento (GH), los factores de crecimiento a través de los cuales realiza su acción, en especial el factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGF-1) y algunas de sus proteínas transportadoras reguladas también por la GH, como la proteína 3 enlazante del factor de crecimiento insulinoide (IGFBP-3) o la subunidad ácido-lábil (ALS)⁽¹⁾.

El IGF-1 es un péptido con una estructura homóloga a la proinsulina que se sintetiza en el hígado y en múltiples tejidos bajo la acción de la GH. Tiene acción estimuladora del crecimiento, potencia la acción de la insulina y regula la proliferación celular. Ejerce un retrocontrol negativo sobre la secreción de la GH, a nivel hipofisario e hipotalámico. Es el principal marcador periférico de acción de la GH y es el que mejor se correlaciona con el estado secretor de GH en la vida postnatal. La medición de su concentración en el suero es útil en el diagnóstico de los déficits de secreción de GH, aunque tiene una baja sensibilidad diagnóstica. En cambio, para el diagnóstico del exceso de secreción de GH, esta magnitud presenta una elevada sensibilidad y especificidad diagnósticas^(2,3).

La medición de la concentración de IGF-1 en el suero es especialmente importante en los casos de insensibilidad o resistencia a la GH, en los que sus valores

Correspondencia:

Maria Luisa Granada Ybern
Servicio de Bioquímica
Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona
mgranada.germanstrias@gencat.net

son muy bajos mientras que los de la GH pueden estar aumentados.

La insensibilidad a la GH o déficit primario de IGF-1 se caracteriza por una inadecuada producción de IGF-1 a pesar de que la secreción de GH sea suficiente. Desde el punto de vista clínico los pacientes presentan un trastorno grave del crecimiento. La forma clásica de insensibilidad a la GH es el síndrome de Laron⁽⁴⁾ causado por mutaciones en el receptor de la GH. Sin embargo, recientemente, se han descrito alteraciones en distintos genes que codifican a las proteínas que participan en la cascada de señalización de este receptor (como STAT5B), así como en los genes que codifican el propio IGF-1 (IGF-1), su receptor (IGF1R) y la subunidad ácido-lábil (ALS)⁽⁵⁾. Actualmente, se considera que existe un amplio espectro de síndromes de resistencia a la GH causados por defectos en distintas localizaciones del eje somatotropo⁽⁶⁾ que difieren en ciertas características clínicas y en sus comorbilidades asociadas, según el tipo de alteración genética. Todos ellos presentan como denominador común, la presencia de un retraso muy importante del crecimiento (talla < -3 SD) y una concentración de IGF-1 en el suero muy disminuida⁽⁷⁾.

I. Factores a considerar en relación a la medición de la concentración de IGF-1 en el suero

La concentración de IGF-1 en el suero se mide actualmente en un gran número de laboratorios clínicos. Sin embargo, para poder interpretar sus resultados de forma adecuada es necesario conocer una serie de factores inherentes a su propia fisiología, así como diferentes aspectos metodológicos que influyen en su medición.

I.1.1. Variabilidad biológica interindividual de la IGF-1

Las concentraciones de IGF-1 presentan grandes variaciones en función de la edad, el sexo y el desarrollo puberal. Durante los primeros años de la vida las concentraciones son muy bajas, aumentando progresivamente durante la infancia hasta presentar un fuerte incremento al llegar a la pubertad, que se acompaña de un aumento paralelo de la secreción de GH y de esteroides gonadales. Sus concentraciones son máximas en el adulto joven y, a partir de entonces, durante la vida adulta se produce una disminución lenta y progresiva de las mismas. Las concentraciones de IGF-1 son algo más elevadas en el sexo femenino, sobre todo en la pubertad, adelantándose en 1-2 años al pico máximo observado para los varones, debido fundamentalmente a las diferencias madurativas^(8,9). Por el contrario, en adultos, el promedio de sus concentraciones en hombres es algo más elevado que en mujeres, aunque en muchos estudios estas diferencias no llegan a ser significativas⁽¹⁰⁾.

I.1.2. Variabilidad biológica intraindividual de la IGF-1

La concentración de IGF-1 presenta una gran variabilidad biológica intraindividual. En diversos estudios se ha observado que las concentraciones de IGF-1 obtenidas en individuos sanos, en un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 3 semanas, pueden variar entre el 10% y el 36%^(11,12). Teniendo presente esta gran variabilidad biológica, el diagnóstico debería llevarse a cabo tras realizar varias mediciones de esta magnitud a lo largo de un periodo de tiempo determinado y no a partir de un único resultado puntual, en especial, cuando las concentraciones de IGF-1 se hallan cerca de los límites de decisión clínica⁽³⁾.

A diferencia de las concentraciones de GH en el suero, las concentraciones de IGF-1 son relativamente estables a lo largo del día. No presentan ritmo circadiano ni fluctuaciones significativas relacionadas con la ingesta de alimentos.

I.1.3. Estado nutricional

El estado nutricional afecta considerablemente a las concentraciones de IGF-1 y a alguna de sus proteínas transportadoras, en especial la proteína 1 enlazante del factor de crecimiento insulinoide (IGFBP-1). En situaciones de malnutrición o ayuno prolongado así como en estados catabólicos, diabetes mellitus descompensada, insuficiencia hepática o renal, se produce una resistencia a la acción de la GH que da lugar a que las concentraciones de IGF-1 estén disminuidas.

I.2.1. Separación de las proteínas transportadoras

El IGF-1 circula en su mayor parte unido a proteínas transportadoras de alta afinidad formando complejos de alto peso molecular, fundamentalmente con la IGFBP-3 y la ALS, de forma que para medir la concentración de IGF-1 total es necesario realizar una separación previa⁽¹³⁾. El método de referencia para separar el IGF-1 de sus proteínas transportadoras es la cromatografía de exclusión molecular o de filtración en gel, que emplea una columna Sephadex[®] (columna rellena de una resina de dextrano) como fase estacionaria y una solución acuosa a pH ácido como fase móvil. Este método es muy laborioso y por consiguiente no es aplicable para la mayoría de laboratorios clínicos, por lo que en la práctica clínica se han utilizado diferentes métodos de extracción para separar los IGFs de sus proteínas transportadoras, con una eficiencia variable, como la extracción en fase sólida, la precipitación con ácido-etanol o la ultracentrifugación, entre otros⁽¹⁴⁾. En la actualidad, el método más utilizado es la separación funcional con exceso de IGF-2 descrito inicialmente por Blum *et al.*⁽¹⁵⁾ ya que se ha podido adaptar fácilmente a diferentes plataformas de inmunoanálisis automatizados. Este método consiste en acidificar el medio para romper el

Tabla 1. Características de los principales analizadores para medir la concentración de IGF-1 en el suero.

	Immulite® Siemens	iSYS® IDS	Liaison® DiaSorin
Tipo de inmunoanálisis	Sandwich	Sandwich	Sandwich
Sistema de detección	Quimiluminiscente	Quimiluminiscente	Quimiluminiscente
Material de referencia	WHO IRR 87/518	WHO IRR 02/254	WHO IRR 02/254
Límite de cuantificación	20 ng/mL	4,4 ng/mL	3 ng/mL
Sensibilidad funcional	25 ng/mL*	8,8 ng/mL	15 ng/mL

* No se especifica pero la menor concentración de IGF-1 reportada es de 25 ng/mL

complejo ternario IGF/IGFBP/ALS, y añadir posteriormente un exceso de IGF-2 para bloquear los lugares de unión de la IGFBP-3, quedando así el IGF-1 libre en la muestra para que su concentración pueda ser medida.

1.2.2. Procedimientos de medida

No existe un procedimiento de medida de referencia o "gold standard" para la medición de la concentración de IGF-1 en el suero. El procedimiento utilizado en los laboratorios clínicos es el inmunoanálisis, es decir se basa en la reacción antígeno-anticuerpo (anticuerpos que reconocen la molécula de IGF-1). Inicialmente, se utilizaron radioinmunoanálisis competitivos que empleaban anticuerpos policlonales y marcaje con isótopos radioactivos. Posteriormente, aparecieron los inmunoanálisis no competitivos o tipo "Sandwich" con dos anticuerpos monoclonales, dotados de una mayor sensibilidad y especificidad analítica⁽¹⁶⁾. La aparición de inmunoanálisis con detección quimiluminiscente permitió que éstos se pudieran automatizar y, en la actualidad, la mayoría de laboratorios clínicos utilizan estos procedimientos automatizados para medir la concentración de IGF-1⁽¹⁷⁾.

Durante varios años la mayoría de los inmunoanálisis utilizados estaban calibrados frente al patrón internacional WHO NIBSC 87/518. Se trataba de un patrón de baja pureza (alrededor del 44%), cuyo contenido proteico fue asignado mediante consenso. Posteriormente se demostró, mediante un análisis cuantitativo de aminoácidos, que la concentración asignada era superior a la "real"⁽¹⁸⁾ y, por lo tanto, la mayoría de datos sobre las concentraciones de IGF-1 disponibles en la literatura sobreestiman las concentraciones reales de IGF-1. En el año 2009 se aprobó un nuevo patrón internacional para la IGF-1, codificado como WHO NIBSC IS 02/254, que contiene IGF-1 recombinante (r-IGF-1) con una pureza superior al 97%⁽¹⁹⁾. El uso del nuevo patrón se ha traducido en que las concentraciones de IGF-1 obtenidas son más bajas.

II. Situación actual de los procedimientos de medida utilizados para medir la concentración de IGF-1 en el suero

El estado actual de los inmunoanálisis para la IGF-1 es la progresiva implantación de los procedimientos automatizados en los laboratorios clínicos. Las principales plataformas para medir la concentración de IGF-1 disponibles en nuestro país son los analizadores de la serie Immulite® (Siemens Healthcare Diagnostics)⁽²⁰⁾, el analizador IDS-iSYS® (Immunodiagnostic Systems; IDS)⁽²¹⁾ y los analizadores de la serie Liaison®⁽²²⁾, cuyas características principales se muestran en la tabla 1. Todos ellos utilizan el mismo método de separación de las proteínas transportadoras, 2 anticuerpos monoclonales anti-IGF-1 y la quimiluminiscencia como sistema de detección. Existen, sin embargo, diferencias en el patrón internacional frente al que están calibrados. Mientras que los analizadores Liaison® (DiaSorin) y IDS-iSYS® (IDS) ya están calibrados frente al nuevo patrón de referencia WHO NIBSC IS 02/254, tal como recomiendan las guías internacionales, los analizadores Immulite® (Siemens) siguen calibrados frente al patrón WHO NIBSC 87/518, por lo que los resultados para estos últimos analizadores son mucho más elevados⁽²³⁾.

Existen también diferencias en la sensibilidad o límite de cuantificación entre estos analizadores, es decir en la menor concentración de IGF-1 que puede distinguirse de "cero" o de un blanco adecuado, así como en la sensibilidad funcional, es decir la mínima concentración de IGF-1 que puede medirse de una manera fiable con cada analizador. A pesar de que los analizadores actuales tienen mucha mayor sensibilidad que los radioinmunoanálisis clásicos, la menor concentración que se puede medir con el método de Immulite® (Siemens) es de 25 ng/mL, mientras que con los otros 2 ensayos, la mínima concentración que podemos medir con garantía es de 8,8 ng/mL para IDS-iSYS® y de 15 ng/mL para Liaison® (tabla 1).

III. Expresión de los resultados de la concentración de IGF-1 en el suero

Cuando se realizan mediciones de magnitudes que presentan una gran variación de valores en función de la edad y el sexo, como por ejemplo medidas antropométricas como la talla y el peso o algunas magnitudes hormonales, los resultados obtenidos en un individuo en concreto se deben comparar con los valores obtenidos en una población de referencia que han sido calculados a partir de diferentes estadísticos como la media, la mediana y los percentiles o bien, mediante el cálculo de la puntuación de desviación estándar o SDS (acrónimo del inglés Standard Deviation Score) o puntuación Z. El uso de la SDS es una práctica habitual en pediatría para expresar los datos antropométricos⁽²⁴⁾. El sistema SDS expresa el número de desviaciones estándar o puntuaciones Z en que un dato se sitúa por encima o por debajo de la media o la mediana de la población de referencia. En el sistema SDS, los valores de la población de referencia siguen una distribución normal (distribución de Laplace-Gauss) donde el valor de la media o de la mediana se corresponde con el 0 y el intervalo comprendido entre +2 SDS (percentil 97,5) y -2 SDS (percentil 2,5) contiene el 95% de los valores.

La fórmula para calcular SDS es:

$$\text{SDS} = (\text{valor observado} - \text{valor de la mediana de la población de referencia}) / [\text{valor de la desviación estándar de la población de referencia}]$$

Las guías internacionales aconsejan expresar los resultados de la concentración de IGF-1 en el suero respecto a una población de referencia de la misma edad y sexo⁽³⁾. Sin embargo, los valores de referencia de IGF-1 no siguen una distribución normal, por lo que para calcular el SDS debe realizarse una transformación matemática previa que consiga la normalización de estos datos. Esto complica en gran manera el cálculo de SDS que debe realizarse a través de hojas de cálculo o mediante programas que nos faciliten esta tarea.

En la figura 1 se representa de forma gráfica los valores de referencia para la concentración de IGF-1, en ng/mL, para los analizadores Liaison® (DiaSorin) así como la representación gráfica de dichos valores expresados en SDS.

Algunas estrategias utilizadas para normalizar la distribución de los valores de la concentración de IGF-1 consisten en aplicar transformaciones logarítmicas o exponenciales de las mismas.

Por ejemplo, los valores de referencia de los analizadores Immulite® (Siemens) se pueden normalizar realizando una transformación logarítmica de los mismos, así el cálculo de SDS se podría realizarse a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{SDS} = (\text{Ln IGF-1 en el paciente} - \text{Ln de la mediana de IGF-1 en el grupo de edad}) / [\text{desviación estándar del IGF (Ln) grupo de edad}]$$

Ln: logaritmo neperiano

En el caso de los analizadores Liaison® (DiaSorin) y IDS-ISYS® (IDS) se puede realizar el cálculo de SDS tras elevar los valores a (0,4). En estos casos, el cálculo de la SDS se realizaría mediante la siguiente fórmula:

$$\text{SDS} = [(\text{IGF-1}^{(0,4)} \text{ en el paciente}) - (\text{mediana de IGF-1}^{(0,4)} \text{ en el grupo de edad})] / [\text{desviación estándar del IGF-1}^{(0,4)} \text{ en el grupo de edad}]$$

Sin embargo, en la práctica clínica habitual, es suficiente conocer si la concentración de IGF-1 de un paciente está dentro de los valores de referencia (entre -2SDS y +2SDS).

En la actualidad los proveedores de los analizadores proporcionan valores de referencia, por edad y sexo, obtenidos a partir de un número adecuado de sujetos presuntamente sanos. Estos datos están disponibles en los folletos de cada uno de los equipos de reactivos de cada analizador y cada laboratorio los facilitará al clínico que lo solicite^(20,21,22).

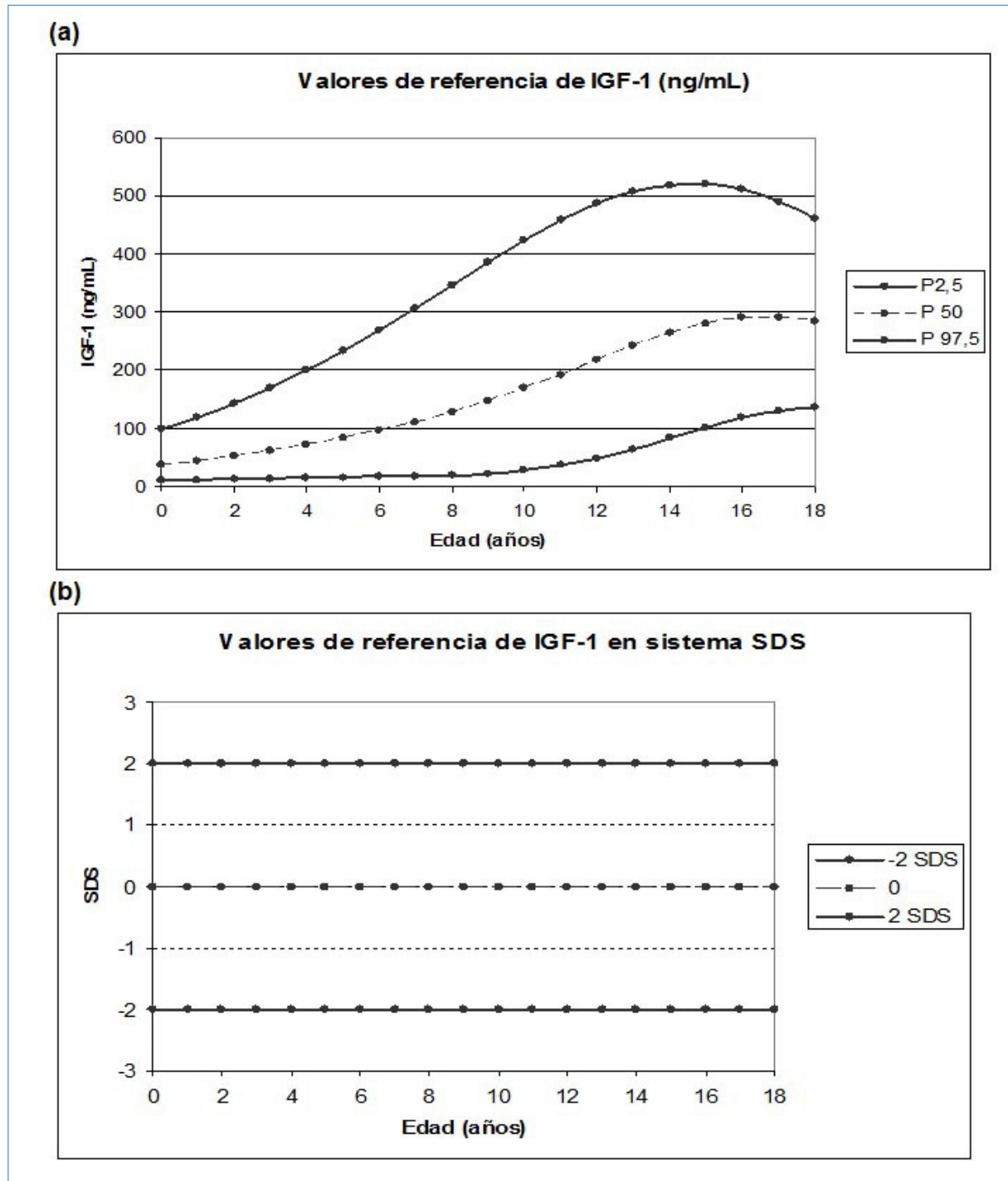
Además, en algunos casos, estos datos pueden obtenerse de artículos publicados en la literatura. En ellos se detalla la población de referencia utilizada, el número de individuos en cada grupo (edad y sexo) así como los cálculos realizados para su obtención^(25,26,27).

En la tabla 2 se muestran las concentraciones de IGF-1 equivalentes a -2 SDS (percentil 2,5) para los analizadores más frecuentemente utilizados, para individuos con una edad comprendida entre 0 y 18 años de edad. Por otro lado, en la Figura 2, puede observarse la representación gráfica de dichos valores.

A modo de ejemplo, en una niña de 8 años, una concentración de IGF-1 de 63 ng/mL se hallará dentro del intervalo de referencia si el resultado lo hemos obtenido con el analizador IDS-ISYS® (-1,79 SDS) o con un analizador Liaison® (-1,45 SDS), pero si la medición se ha realizado con un analizador Immulite® el resultado será patológico (-2,0 SDS).

Un niño de 6 años con una concentración de IGF-1 en el suero de 50 ng/mL será estrictamente normal si el resultado se ha obtenido con un analizador Liaison® (-0,9 SDS), pero estará por debajo del intervalo de referencia respecto al grupo de su misma edad y sexo si la medición se ha realizado con el analizador IDS-ISYS® (-2,16 SDS) o con un analizador Immulite® (-2,08 SDS).

Figura 1. Representación gráfica de los valores de referencia (en ng/mL) de IGF-1 en el suero (P-2,5 / P-50 / P-97,5) con el analizador Liaison (DiaSorin) (a) y representación gráfica de los valores transformados del intervalo comprendido entre ± 2 SDS (b).



IV. Conclusión

Existe mucha variabilidad en los resultados de la concentración de IGF-1 en el suero medidos por diferentes analizadores ya que, a los factores clásicos de discrepancia como son los diferentes anticuerpos y la estandarización, se añade la variabilidad de los métodos para separar las proteínas transportadoras ⁽¹⁰⁾.

Esta variabilidad entre los inmunoanálisis y entre sus valores de referencia para la concentración de IGF-1 en el suero hace que los resultados obtenidos con diferentes procedimientos de medida no sean intercambiables. Por ello, es de gran utilidad transformar las concentraciones de IGF-1 en puntuaciones de desviación estándar (SDS) respecto a la edad, sexo y estadio puberal, si se dispone de estos valores. Para

Figura 2. Concentración de IGF-1 en el suero equivalente a -2,0 SDS para sexo masculino (a) y sexo femenino (b) en tres analizadores.

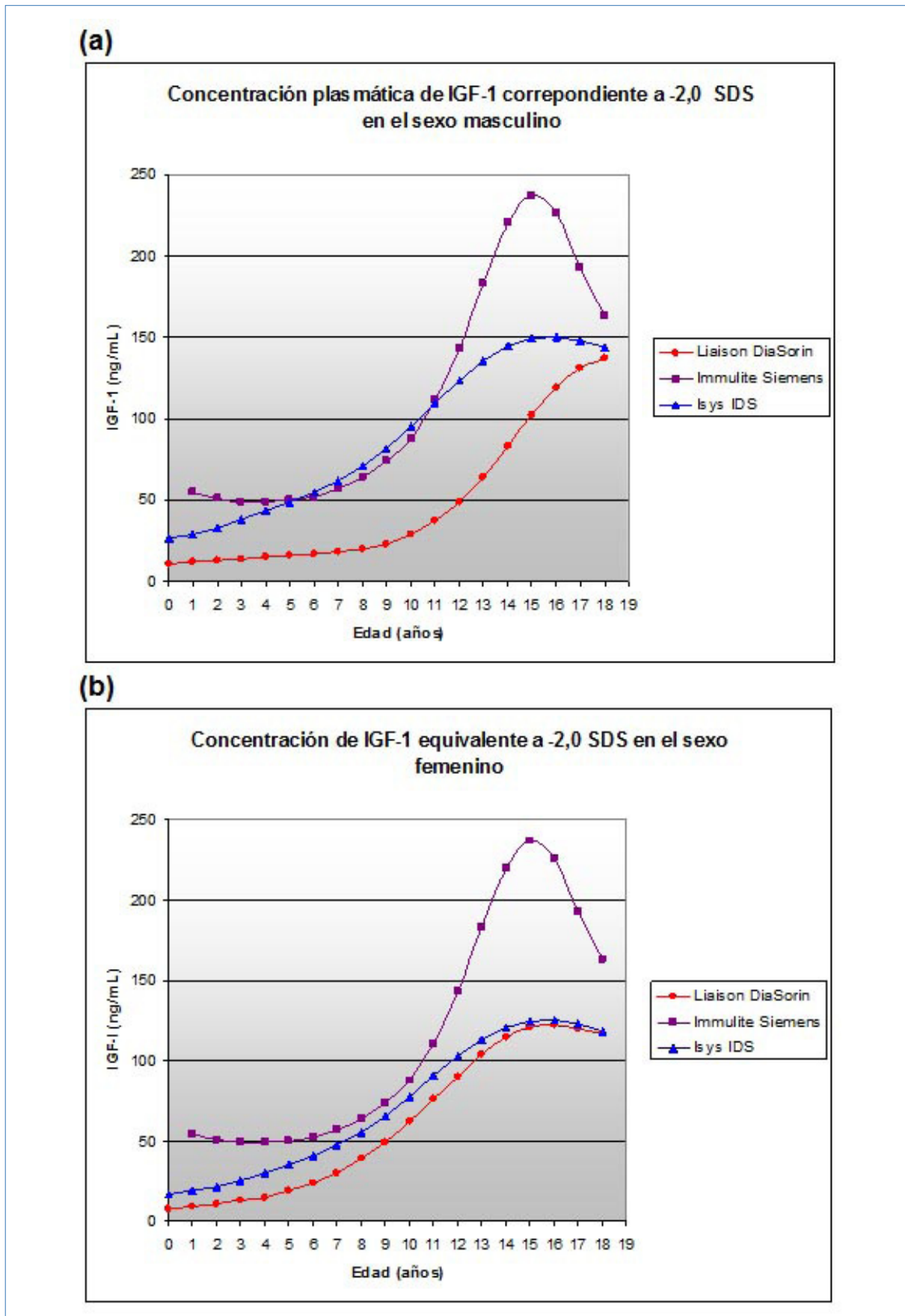


Tabla 2. Concentración de IGF-1 en el suero (ng/ml) correspondiente a -2 SDS en los tres analizadores.

Immulate® (Siemens) ^a		IDS-iSYS® (IDS)		Liaison® (DiaSorin)	
Edad (años)	Sexo masculino y femenino	Sexo femenino	Sexo masculino	Sexo femenino	Sexo masculino
0	<25,0 ^d	17,3	26,3	8	11
1	55,0	18,9	28,9	9	12
2	51,0	21,5	33	11	13
3	49,0	25,2	38	13	14
4	49,0	29,8	43,2	15	15
5	50,2	35,2	48,8	19	16
6	52,0	40,8	54,9	24	17
7	57,0	47,4	62	30	18
8	64,0	55,4	70,9	39	20
9	74,0	65,5	81,9	49	23
10	88,0	77,5	95	62	29
11	11,0	90,4	109,4	76	37
12	143,0	102,7	123,7	90	49
13	183,0	113,3	136	104	64
14	220,0	120,7	144,8	115	83
15	237,0	124,7	149,4	121	102
16	226,0	125,2	150,2	122	119
17	193,0	122,7	148,1	120	131
18	163,0	118,1	143,8	117	137

a: Prospecto Immulite®2000 IGF-I (ref. PIL2KGF19) Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd. Llanberis, United Kingdom ⁽²⁰⁾

b: Prospecto IDS-iSYS® IDS IGF-1 (ref. IS-3900) Immunodiagnostic Systems Limited (IDS Ltd) Boldon, UK ⁽²¹⁾

c: Prospecto Liaison® IGF-I DiaSorin (ref. 313231) Saluggia, Italy ⁽²²⁾

d: Para este rango de edad sólo se aportan datos de neonatos

cualquier edad, la normalidad definida como los valores comprendidos entre el percentil 2,5 y el percentil 97,5 se corresponden con las puntuaciones de desviación estándar entre -2 SDS y +2 SDS.

Referencias Bibliográficas

1. Growth Hormone Research Society. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:3990-3.
2. Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. Growth Horm IGF Res 2003;13:113-70.
3. Clemmons DR. Consensus statement on the standardization and evaluation of growth hormone and insulin-like growth factor assays. Clin Chem 2011;57:555-9.
4. Laron Z, Pertzalan A, Mannheimer S. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone-a new inborn error of metabolism?. Isr J Med Sci 1966;2:152-5.
5. Wit JM, Oostdijk W, Losekoot M. Spectrum of insulin-like growth factor deficiency. Endocr Dev 2012;23:30-41.
6. Savage MO. Phenotypes, investigation and treatment of primary IGF-1 deficiency. Endocr Dev 2013;24:138-49.
7. Wit JM. Diagnosis and management of disorders of IGF-I synthesis and action. Pediatr Endocrinol Rev 2011;9 Suppl 1:538-40.
8. Juul A, Dalgaard P, Blum WF, et al. Serum levels

- of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children, and adolescents: the relation to IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2534-42.
9. Brabant G, von zur Mühlen A, Wüster C, et al.; German KIMS Board. Serum insulin-like growth factor I reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: results from a multicenter study. *Horm Res* 2003;60:53-60.
 10. Granada ML, Ulied A, Casanueva FF, et al. Serum IGF-I measured by four different immunoassays in patients with adult GH deficiency or acromegaly and in a control population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68:942-50.
 11. Milani D, Carmichael JD, Welkowitz J, et al. DL. Variability and reliability of single serum IGF-I measurements: impact on determining predictability of risk ratios in disease development. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2271-4.
 12. Nguyen TV, Nelson AE, Howe CJ, et al. Within-subject variability and analytic imprecision of insulinlike growth factor axis and collagen markers: implications for clinical diagnosis and doping tests. *Clin Chem* 2008;54:1268-76.
 13. Bang P, and participants in the 3rd International symposium on insulin-like growth factors. Valid measurements of total IGF concentrations in biological fluids. *Endocrinology* 1995;136:816-7.
 14. Mohan S, Baylink DJ. Development of a simple valid method for the complete removal of insulinlike growth factor (IGF)-binding proteins from IGFs in human serum and other biological fluids: Comparison with acid-ethanol treatment and C18 Sep-Pak separation. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:637-47.
 15. Blum WF, Breier BH. Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. *Growth Regul* 1994;4 (Suppl 1):1-19.
 16. Clemmons DR. Commercial assays available for insulin-like growth I and their use in diagnosing growth hormone deficiency. *Horm Res* 2001;55(Suppl 2):73-79.
 17. Granada Ybern ML, Gómez Gómez C, Moreno Flores F, Audí Parera L. Problemática de las determinaciones hormonales del eje GH-IGF (hormona de crecimiento – factor de crecimiento insulinoide tipo 1). *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2013;4 (Suppl 1):15-28.
 18. 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;83:1211-6.
 19. Burns C, Rigsby P, Moore M, Rafferty B. The First International Standard For Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) for immunoassay: preparation and calibration in an international collaborative study. *Growth Horm IGF Res* 2009;19:457-62.
 20. Insert Immulite®2000 IGF-I (ref. PIL2KGF19) Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd.Llanberis, United Kingdom.
 21. Insert iSYS® IDS (ref. IS-3900) Immunodiagnostic Systems Limited (IDS Ltd) Boldon, UK.
 22. Insert Liaison® IGF-I DiaSorin (ref. 313231) Saluggia, Italy.
 23. Gomez-Gomez C, Iglesias EM, Barallat J, Moreno F, Biosca C, Pastor MC, Granada ML. Lack of transferability between two automated immunoassays for serum IGF-I measurement. *Clin Lab* Nov 2014;60: 1859-64. <http://dx.doi/10.7754/Clin.Lab.2014.140318>.
 24. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series No. 854. Geneva: World Health Organization, 1995.
 25. Bidlingmaier M, Friedrich N, Emeny RT, et al. Reference intervals for insulin-like growth factor-1 (IGF-I) from birth to senescence: results from a multicenter study using a new automated chemiluminescence IGF-I immunoassay conforming to recent international recommendations. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:1712-21.
 26. Alberti C, Chevenne D, Mercat I, et al. Serum concentrations of insulin-like growth factor (IGF-1) and IGF binding protein-3 (IGFBP-3), IGF-1/IGFBP-3 ratio, and markers of bone turnover: reference values for French children and adolescents and z-score comparability with other references. *Clin Chem* 2011;57:1424-35.
 27. Elmlinger MW, Kühnel 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.