

# Misurare la concentrazione del testosterone totale e del testosterone libero può essere dannoso alla salute: il Position Statement 2007 dell'Endocrine Society\*

Romolo M. Dorizzi

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

*Sapere cosa è giusto e non farlo è mancanza di coraggio.  
Il Maestro pescava con l'amo mai con la rete.*

*Confucio (551 A.C., Zou, Cina-479 A.C., Qu Fu, Cina)*

## Summary

### **To assay the concentration of Total and Free Testosterone may be harmful to health: the 2007 Position Statement of the Endocrine Society**

Serum total testosterone and free testosterone levels are being measured in thousands laboratories worldwide, but since there is no universally recognized testosterone calibrating standard different laboratories frequently produce variable results. Since inaccurate results are unhelpful at best, or harmful in worst-case situations, the Endocrine Society, in order to improve this situation, appointed a panel of five experts, chaired by Dr. Rosner, to examine published data and to make the proper recommendations. They published in the February 2007 issue of the Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism a Position Statement with the title "Utility, Limitations, and Pitfalls in Measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement," that underwent many rounds of review by the expert panel, review and approval by the Council, and peer review by The Journal.

The content of the paper has been here summarized and further specific references from the laboratory field has been added in order to promote among the laboratorians the knowledge of the Statement. In our opinion the laboratory professionals should accept and

embrace its recommendations. The major conclusions are as: 1) laboratory proficiency testing should be based on the ability to measure accurately and precisely samples containing known concentrations of testosterone, not only upon agreement with others using the same method. 2) When such standardization is in place, normative values for total and free testosterone should be established for both genders and for children taking into account the many variables that influence serum testosterone concentration. Moreover, other recommendations should be implemented in the interim. According to us the most urgent are: 1) The laboratorians and the clinicians should know the type and quality of the assay that is being used, and reference intervals for that assay should be properly established by each laboratory in collaboration with endocrinologists, using well defined and characterized populations. 2) Direct assays poorly measure low testosterone concentrations and should be avoided. 3) The recommended screening test for male hypogonadism is the measurement of serum Total Testosterone on more than one morning sampling. 4) Calculated Free Testosterone, measured using high quality Testosterone and SHBG assays with well defined reference intervals, is the most useful, clinically sensitive marker of hyperandrogenemia in women.

\*Fattori di conversione unità convenzionale-unità SI

Testosterone totale: ng/dL X 0.0347 = nmol/L

Testosterone libero: pg/mL X 3.467 = pmol/L

La determinazione del testosterone nel plasma e nel siero presenta nella donna e nel bambino seri problemi di accuratezza e di sensibilità e nel maschio problemi di accuratezza. In generale la tecnologia ha migliorato le prestazioni dei metodi immunometrici commerciali in termini di sensibilità e precisione ma questo non può e non deve essere trasferito a tutti gli ormoni. Il testosterone rappresenta uno dei casi più particolari e nei mesi scorsi la Endocrine Society ha incaricato una Task Force costituita da 5 dei maggiori esperti in questo ambito di valutare le pratiche correnti nella determinazione in ambito clinico di testosterone totale e libero, sulla base della letteratura corrente e del parere degli opinion leader<sup>1,2</sup>.

L'autorevolezza del gruppo di esperti che ha lavorato sul Position Statement è tale che potrebbe influenzare in modo determinante le prossime evoluzioni nella messa a punto dei metodi di determinazione del testosterone totale (TT) e libero (TL) negli Stati Uniti e nel resto del mondo.

### Metodi per la determinazione del testosterone totale

I metodi radioimmunologici ed in chemiluminescenza diretti o dopo estrazione/ cromatografia sono i più usati. Questi ultimi rimuovono le proteine interferenti e gli steroidi cross-reagenti consentendo determinazioni più accurate e sensibili. Metodiche in spettrometria di massa (MS) ottimizzano queste prestazioni anche se non sono ancora del tutto standardizzate. La confrontabilità dei metodi disponibili può essere esemplificata dai risultati dei programmi di VEQ più autorevoli come quelli del College of American Pathologists (Tab. I). Anche se gli analizzatori impiegati possono essere ricondotti ad un numero limitato di tipologie (circa un terzo dei laboratori usa lo stesso analizzatore e tre analizzatori coprono due terzi del mercato), la imprecisione con cui si misura il TT è rilevante. Questa situazione era già stata dibattuta esaurientemente nella letteratura laboratoristica e clinica. Taieb et al. hanno confrontato ad un metodo in spettrometria di massa otto metodi automatici: Architect i2000 (Abbott), ACS-180 ed Immuno-1 (Bayer-Siemens), Vidas (Bio-Merieux), Immulite 2000 (DPC-Siemens), Vitros Eci (Ortho), AutoDelfia (Perkin-Elmer), Elecsys 2010 (Roche) e due metodi RIA manuali: Immunotech e Coat-A-Count (DPC-Siemens) in 116 campioni (50 ottenuti in maschi, 55 in femmine e 11 in bambini)<sup>3</sup>. Anche se lo studio non ha valutato la confrontabilità dei singoli dati ma solo quella della mediana, questa è risultata significativamente diversa da quella della MS con l'eccezione di Vidas e Vitros nelle donne e di Architect, Immuno-1 e Coat-A-Count nel maschio. Nel maschio i risultati di tutti i metodi, con l'eccezione dell'Autodelfia, sono ben correlati alla MS ( $r$  compresa tra 0.92 e 0.97) mentre nei campioni delle femmine la correlazione era molto peggiore ( $r$  compresa tra 0.57 e 0.89). L'analisi dei risultati, impiegando il Bland Altman plot, ha mostrato

nei maschi una differenza tra MS e metodi immunometrici (che sottostimavano nel 70% dei casi) compresa tra -4.70 (Elecsys, Roche) e 2.55 mmol/l di (ACS-180, Bayer-Siemens) e nelle femmine compresa tra -0.69 mmol/l (Elecsys) e 3.29 mmol/l di (Immulite 2000, DPC-Siemens).

Uno dei dati più preoccupanti è che ACS 180 ed Autodelfia, usando il limite inferiore dell'intervallo di riferimento, hanno classificato come eugonadici rispettivamente il 100% e l'89% dei soggetti ipogonadici. Tajeb et al. confermano quindi le perplessità che metodi come quello di ACS 180 avevano suscitato in passato; questo metodo non è in grado di differenziare soggetti ipo- ed eugonadici. La situazione è ancora peggiore nella femmina e Taieb et al. concludono che ACS-180, Architect, AutoDelfia, Immulite 2000, Immuno-1, Immunotech e Coat-A-Count danno risultati molto diversi dalla MS con una elevata percentuale di valori falsamente patologici, mentre Vitros e Vidas danno risultati non significativamente diversi con una minore percentuale di risultati falsi positivi (anche se con numerosi falsi negativi).

Wang et al. hanno confrontato le prestazioni di quattro analizzatori automatici (Centaur, Bayer-Siemens; Elecsys, Roche; Immulite 2000, DPC-Siemens; Vitros Eci, Ortho), due metodi immunometrici manuali [RIA (DPC-Siemens) e HUMC (RIA)] ed un metodo in Cromatografia Liquida-MS<sup>4</sup> in 62 soggetti eugonadici e 60 soggetti ipogonadici. Questi autori hanno riportato una correlazione dei diversi analizzatori con il metodo di riferimento buona ( $r$  compresa tra 0.92 e 0.97); tuttavia i risultati di Immulite 2000 (DPC-Siemens) presentavano un bias medio negativo di  $90 \pm 8.7$  ng/dL, e quelli di Centaur (Bayer-Siemens) uno positivo di  $99 \pm 11$  ng/dL. A concentrazioni di TT < 100 ng/dl (3.47 nmol/L) HUM (RIA) sovrastimava mentre Vitros Eci (Ortho) sottostimava e DPC (RIA) e Elecsys (Roche) presentavano in campioni diversi sovrastima e sottostima. Gli autori hanno concluso che, anche se i metodi immunometrici sono in grado di distinguere maschi eugonadici ed ipogonadici, una volta che il laboratorio ha prodotto un intervallo di riferimento adeguato, la loro imprecisione ed inaccuratezza ne preclude l'uso nelle femmine e nei bambini. I limiti degli attuali intervalli di riferimento per il TT è suggerita dal fatto, per esempio, che l'intervallo di riferimento per Centaur (Bayer-Siemens), nonostante la sovrastima di questo metodo, è di circa il 30% più basso di quello definito per la MS. Anche Wang et al. concludono che nessuno dei metodi automatici è accettabile per la determinazione del TT nella donna e nel bambino. I due articoli di Taieb et al. e di Wang et al. sono stati accompagnati da due puntuali ed accurati editoriali rispettivamente su *Clinical Chemistry* e sul *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Il tono di Herold e Fitzgerald è icastico: partendo dalla considerazione che il gruppo francese aveva dimostrato che tutti i metodi misuravano il TT con un margine di er-

**Tabella I.** Risultati del VEQ del College of American Pathologists per la determinazione del Testosterone totale a tre concentrazioni esemplificative per femmina normale (campione 1), maschio ipogonadico o femmina iperandrogenica (campione 2), maschio (campione 3) (Da rif.1 modificato).

### Campione 1

<i>Analizzatore</i>	<i>Laboratori</i>	<i>Media/DS (ng/L)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Valori estremi</i>
Bayer ACS: 180/Centaur	368	30.9/9.5	30.7	9-53
Beckman Access 2/UniCel Dxl	213	31.3/5.3	17.0	12-44
DPC Coat-a-Count	40	27.1/4.2	15.4	20-36
DPC Immulite 1000/2000/2500	194	51.2/9.2	18.0	26-77
Roche Elecsys 1010/2010/E170	142	25.1/7.0	27.7	7-43
Tosoh AIA-Pack	12	43.8/14.0	32.0	17-71
Vitros Eci	83	18.4/2.7	14.5	13-26
Spettrometria di massa	5	31.8		24-33
<i>Tutti gli analizzatori</i>	<i>1108</i>	<i>32.7/11.4</i>	<i>34.9</i>	<i>7-100</i>

### Campione 2

<i>Analizzatore</i>	<i>Laboratori</i>	<i>Media/DS (ng/L)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Valori estremi</i>
Bayer ACS: 180/Centaur	381	96.9/10.8	11.1	64-130
Beckman Access 2/UniCel Dxl	207	76.8/5.8	7.6	56-94
DPC Coat-a-Count	42	79.9/8.0	10.4	65-92
DPC Immulite 1000/2000/2500	198	154.3/17.0	11.0	103-200
Roche Elecsys 1010/2010/E170	148	69.7/10.0	14.3	55-105
Tosoh AIA-Pack	12	12 87.8/12.3	14.0	71-108
Vitros Eci	85	78.3/6.2	7.9	64-91
Spettrometria di massa	5	68.6/6.1	8.9	60-77
<i>Tutti gli analizzatori</i>	<i>1133</i>	<i>97.1/31.3</i>	<i>32.2</i>	<i>45-365</i>

### Campione 3

<i>Analizzatore</i>	<i>Laboratori</i>	<i>Media/DS (ng/L)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Valori estremi</i>
Bayer ACS: 180/Centaur	381	424.1/42.6	10.0	328-549
Beckman Access 2/UniCel Dxl	209	402.3/21.	6 5.	332-473
DPC Coat-a-Count	42	413.3/35.7	8.6	324-516
DPC Immulite 1000/2000/2500	198	566.0/59.7	10.5	423-744
Roche Elecsys 1010/2010/E170	150	511.8/28.7	5.6	451-626
Tosoh AIA-Pack	11	636.9/44.8	7.0	555-706
Vitros Eci	84	519.4/26.0	5.0	453-581
Spettrometria di massa	5	354.4/45.4	12.8	281-395
<i>Tutti gli analizzatori</i>	<i>1135</i>	<i>464.9/80.6</i>	<i>17.3</i>	<i>276-744</i>

rore tra il 200% ed il 500%<sup>5</sup>. Arrivavano al paradosso che un generatore casuale di numeri produceva dei risultati più confrontabili con quelli prodotti in Gas-Cromatografia-Spettrometria di Massa a diluizione isotopica (ID-GC/MS) rispetto a tutti metodi impiegati nello studio. Associando la clinica del paziente ai numeri prodotti casualmente si arriverebbe a risultati di gran lunga migliori (e molto più rapidi ed economici) di quelli consentiti dai dosaggi di laboratorio. I metodi RIA, preceduti da una fase di estrazione o cromatografia, possono essere più accurati solo se la fase pre-analitica è messa a punto con attenzione e viene attentamente monitorata. Gli autori esaminano il meccanismo perverso che ha condotto a questa situazione e lo riconducono, a nostro avviso correttamente, alla procedura 510(k) della Food and Drug Administration che regola l'immissione sul mercato dei dispositivi diagnostici negli Stati Uniti. Secondo tale procedura la commercializzazione di un reagente non è subordinato alla

dimostrazione che un dispositivo diagnostico sia accurato ma solo alla sostanziale equivalenza al primo metodo che è stato autorizzato dall'FDA. Purtroppo il primo metodo per la determinazione del TT autorizzato è stato uno dei più inaccurati: l'ACS-180 (Bayer-Siemens). L'attuale legislazione non solo permette ai produttori la commercializzazione di metodi insoddisfacenti, ma li incoraggia ed addirittura li costringe a farlo. Non potrebbero infatti dimostrare la "sostanziale equivalenza" di un metodo accurato a ACS-180 e, paradossalmente, non sarebbero autorizzati a commercializzarlo. Alla esortazione finale ai laboratoristi dell'editoriale di assumere un atteggiamento critico di fronte a metodi di dosaggio che danno meno informazioni del caso si unisce quella di due clinici di Seattle, Matsuoto e Bremner<sup>6</sup> che aggiungono delle considerazioni fisio-patologiche.

La concentrazione di T diminuisce quando la Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) diminuisce (obe-

**Tabella II.** Pregi e difetti principali delle tecnologie impiegate per la determinazione del Testosterone totale (Da rif.1 modificato).

Metodo	Pregi	Difetti
RIA, ELISA o CLIA diretti	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Semplici, rapidi e poco costosi</li> <li>2) Produttività elevata</li> <li>3) Automatizzabile</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Frequente sovrastima del TT</li> <li>2) Sensibile all'effetto matrice</li> <li>3) Poco standardizzati Scarsa accuratezza con TT &lt; 300 ng/dL</li> <li>5) Scarsa qualità degli intervalli di riferimento</li> <li>6) Rifiuti radioattivi (RIA)</li> </ol>
RIA dopo estrazione cromatografica	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Ampia esperienza: disponibili intervalli di riferimento in popolazioni diverse</li> <li>2) L'impiego di volumi maggiori aumenta la sensibilità</li> <li>3) Consente la misurazione di numerosi steroidi separati nella corsa cromatografica</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Dosaggio impegnativo, complesso e costoso</li> <li>2) Richiede elevata competenza tecnica</li> <li>3) Richiede l'uso di solventi organici da smaltire in modo idoneo</li> <li>4) Suscettibili all'effetto matrice</li> <li>5) La precisione del recupero delle fasi estrattive deve essere monitorata attentamente</li> <li>6) Produce rifiuti radioattivi</li> </ol>
MS dopo estrazione e cromatografia liquida o gassosa	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Nella stessa corsa cromatografica possono essere misurati molti steroidi</li> <li>2) Può essere ottenuta una elevata accuratezza</li> <li>3) Produttività comparabile ai metodi RIA preceduta da estrazione e cromatografia</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Costosa</li> <li>2) Poco standardizzata</li> <li>3) Produttività limitata</li> <li>4) Le fasi di derivatizzazione possono introdurre errori</li> <li>5) L'impiego di solventi organici richiede attrezzature idonee particolari</li> </ol>

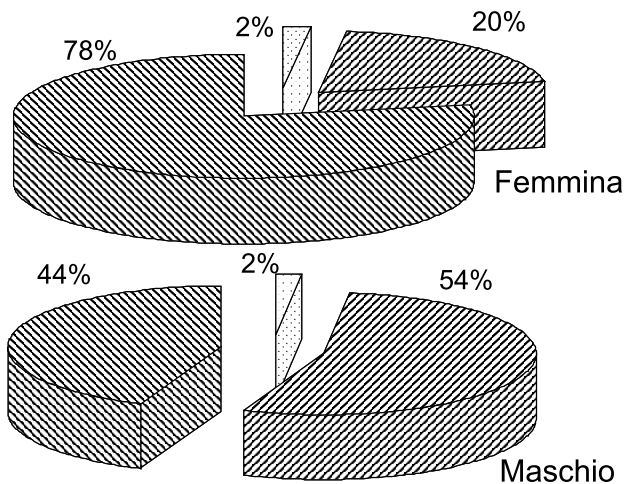
sità, ipotiroidismo, assunzione di glucocorticoidi o progestinici, sindrome nefrosica) ed aumenta quando l'SHBG aumenta (invecchiamento, ipertiroidismo, deficit di androgeni, assunzione di estrogeni o anticonvulsivanti, cirrosi epatica). In tali condizioni può essere utile misurare il T Libero (TL) o il T biodisponibile (Bio-T). Poiché un terzo dei pazienti classificati come ipogonadici sulla base di un solo risultato, sono risultati eugonadici quando il T è stato monitorato nel corso della giornata, una indicazione pragmatica è quella di subordinare la diagnosi di ipogonadismo alla misurazione del TT almeno due volte.

Sacks ripercorre l'approccio dei laboratoristi australiani alla sostituzione dei metodi immunometrici preceduti da estrazione o cromatografia per la determinazione del TT con quelli automatici diretti per far fronte al forte aumento delle richieste degli ultimi anni<sup>7</sup>. Questa possibilità ha ampliato le indicazioni; il TT è misurato non solo per diagnosticare l'ipogonadismo maschile, ma anche l'iperandrogenismo. Le ricadute pratiche della mancanza di standardizzazione dei metodi usati sono rilevanti se si pensa che il Servizio Sanitario Australiano rimborsa la terapia con testosterone solo ai soggetti con una concentrazione di TT < 8 nmol/L. Sacks conclude che è urgente che le aziende commercializzino metodi più affidabili e che i laboratoristi siano consapevoli dei grossi limiti degli attuali e si impegnino ad impiegare quelli *piagati* da bias minori (ad esempio, la spettrometria di massa associata alla cromato-




grafia). Già 10 anni fa Fitzgerald ed Herold avevano segnalato una eccellente correlazione ( $r^2 = 0.98$ ) della spettrometria di massa accoppiata a ionizzazione chimica a cattura di elettroni negativa con l'analizzatore ACS 180 (Bayer-Siemens) nei campioni provenienti dai maschi ed una cattiva correlazione ( $r^2 = 0.31$ ) in quelli provenienti da femmine<sup>8</sup>. Gli immunodosaggi dovevano, pertanto, essere preceduti da una fase di purificazione. Recentemente sono stati messi a punto metodi di MS accoppiata a cromatografia liquida a diluizione isotopica che richiedono campioni molto ridotti (50  $\mu$ L) e consentono una elevata produttività (192 campioni analizzati in 17 ore)<sup>9</sup> e metodi di MS accoppiata a cromatografia liquida-MS che richiedono campioni di soli 100  $\mu$ L, un tempo di analisi di soli 3 minuti e non risentono di interferenze da parte di molecole correlate<sup>10</sup> o campioni di 200  $\mu$ L ed un tempo di analisi ancora inferiore<sup>11</sup>.

Il Clinical Sciences Reviews Committee della Association for Clinical Biochemistry ha recentemente commissionato a Diver e al gruppo di Middle lo studio delle problematiche relative alla interpretazione della concentrazione del testosterone rispettivamente nel maschio<sup>12</sup> e nella femmina<sup>13</sup>. Nel Regno Unito, come nel resto del mondo, il testosterone totale è misurato quasi esclusivamente con un numero sempre più ristretto di analizzatori automatici: il 90% dei risultati del programma di Verifica Esterna di Qualità (VEQ) NEQAS relativi al testosterone sono ottenuti con cin-





**Figura 1.** Distribuzione del Testosterone circolante nel maschio e nella femmina.

-  T legato all'albumina
-  T legato alla SHBG
-  T libero

que piattaforme analitiche automatizzate. E' un dato di fatto che i metodi automatici di oggi forniscono delle prestazioni di sensibilità e specificità non migliori di quelle dei metodi manuali degli anni '70. A differenza dell'LH che presenta una secrezione a spikes nel corso della giornata, il TT ha un ritmo circadiano con un valore massimo al mattino ed una minima alla sera. A meno che la concentrazione di testosterone sia inequivocabilmente nei limiti ( $> 12.5$  nmol/L) o anomala ( $< 7$  nmol/L) una diagnosi di ipogonadismo deve essere fatta sulla base di più determinazioni di TT. Tutti i metodi immunometrici danno dei risultati falsamente elevati in alcuni campioni provenienti da femmine. Il problema è insidioso in quanto, oltre a problemi di calibrazione inaccurata e di interferenze da parte di molecole cross-reagenti ve ne sono altri non identificati e non prevedibili. Oltre alla interferenza del Deidroepiandrosterone solfato (DEAS), inizialmente identificata per l'analizzatore Architect (Abbott)<sup>14</sup> ma successivamente dimostrato per altri analizzatori, come Elecsys (Roche), E170 Modular (Roche) ed Access (Beckman)<sup>15</sup>, ed a quella di farmaci come danazolo e mifepristone (RU486), in alcune pazienti sembra sia presente una interferenza dovuta a coniugati di steroidi. Un approccio pragmatico potrebbe essere quello di rianalizzare con un metodo immunometrico che preveda una fase di estrazione o con la MS tutti i campioni provenienti da femmine con concentrazione di testosterone elevato. I laboratori dovrebbero richiedere nei capitoli di acquisizione del testosterone: 1) un grafico che raffiguri la retta di regressione che confronti i risultati ottenuti con il metodo offerto ed i risultati ottenuti con un metodo in MS validato; 2) un *Difference plot* degli stessi dati. La pendenza della retta di regressione indicherà l'accuratezza del metodo mentre l'in-

tercetta l'abilità del metodo di misurare una concentrazione bassa di analita in presenza di sostanze interferenti<sup>13</sup>. Le concentrazioni molto diverse di TT misurabili nel maschio e nella femmina possono rendere necessari due metodi calibrati in modo diverso. Il problema della determinazione accurata e precisa del testosterone è arrivato, secondo Kane et al., ad un punto tale che solo la collaborazione delle industrie del settore, degli enti di normazione, dei professionisti, degli enti di accreditamento e del governo può correggerli<sup>13</sup>. La Tabella II riassume i pregi ed i difetti dei principali metodi per la determinazione delle frazioni del testosterone.

### Metodi per la determinazione del testosterone libero

Anche se il preciso significato clinico delle diverse frazioni circolanti del testosterone è ancora dibattuto accesamente, vi è accordo sulle loro percentuali relative. Nel maschio circa la metà del T circolante è legato fortemente alla SHBG, circa la metà è legata all'albumina e circa il 2% è in forma libera. Nella femmina la quota libera rimane intorno al 2%, la forma legata all'SHBG è intorno all'80%, e quella legata all'albumina è intorno al 20% (Fig. 1). Classicamente la piena bioattività del T è stata attribuita nel maschio e nella femmina alla piccola percentuale di molecola che circola in forma libera, direttamente o attraverso il suo derivato intracellulare, diidrotestosterone<sup>16</sup>. Partridge, sulla base dell'osservazione che l'emivita di dissociazione del T legato all'albumina era 20 volte minore di quella del T legato all'SHBG, ha ipotizzato che la biodisponibilità del testosterone legato all'albumina potesse essere, almeno in alcuni organi come cervello e fegato, simile a quella del TL. Il concetto di Bio-T (dato dalla somma del testosterone libero e di quello legato all'albumina) ha acquisito consensi<sup>17</sup>. La Tabella III riassume i pregi ed i difetti dei principali metodi per la determinazione delle frazioni del testosterone.

### Determinazione del Testosterone libero (TL)

La misura indiretta del TL è ottenuta aggiungendo al campione T triziato e separando, dopo che è stato raggiunto l'equilibrio, il TL triziato dal T legato triziato. La frazione del TL triziato è poi moltiplicata per il TT misurato con un dosaggio separato. I risultati di questa tecnica dipendono dalla accuratezza della determinazione diretta del T (come del resto la dialisi simmetrica) e dalla purezza della molecola triziata; è intuitivo che una contaminazione dell'1% con un radioattivo che non si lega alle proteine aumenta del 50% la concentrazione misurata del TL.

### Determinazione diretta ed indiretta del Testosterone libero

In letteratura l'unico tentativo di mettere a punto un metodo di riferimento per il TL è quello descritto da

**Tabella III.** Pregi e difetti principali delle tecnologie impiegate per la determinazione del Testosterone libero, del Testosterone non legato e del testosterone biodisponibile (Da rif.1 modificato).

<i>Metodo</i>	<i>Pregi</i>	<i>Difetti</i>
RIA diretti	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Semplici, rapidi e relativamente poco costosi</li> <li>2) Richiedono competenza tecnica minima</li> <li>3) Automatizzabile</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Accuratezza, sensibilità e comparabilità inter-laboratori scarsa soprattutto a causa di: <ul style="list-style-type: none"> <li>- significativo legame dell'analogo alle proteine del siero</li> <li>- mancanza di parallelismo nelle diluizioni seriali</li> </ul> </li> </ol>
Separazione fisica (mediante una membrana, come nella dialisi all'equilibrio) o un filtro (come nell'ultrafiltrazione centrifuga) del T legato alle proteine e quello libero	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Accurato (la dialisi all'equilibrio è considerato il metodo di riferimento)</li> <li>2) Relativamente sensibile e riproducibile</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Relativamente costoso</li> <li>2) Richiede elevata competenza tecnica <ul style="list-style-type: none"> <li>- La dialisi ad equilibrio è influenzata dalla diluizione del campione</li> <li>- L'ultrafiltrazione dipende dall'adsorbimento del T alla membrana e dal controllo preciso della temperatura</li> <li>- Dialisi ed ultra-centrifugazione risentono molto di impurezze tritiate legate da SHBG e/o albumina in maniera diversa dal T</li> </ul> </li> <li>3) Dipende dall'accuratezza del metodo per il T</li> <li>4) Non sufficientemente sensibile per misurare il TL nella femmina e nel bambino</li> </ol>
Bio-T misurato dopo precipitazione con ammonio solfato	Tecnicamente semplice	<p>Può essere inaccurato per:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- uso di T triziato con impurezze</li> <li>- precipitazione incompleta delle globuline</li> <li>- metodologie non uniformi dei diversi laboratori</li> </ul>
Calcolo del FAI (T/SHBG)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Semplice</li> <li>2) Nelle donne buona correlazione con i metodi che prevedono una separazione fisica</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Scarsa correlazione con la misura di separazione fisica nei maschi</li> <li>2) Fortemente dipendenti sulla accuratezza e sulla sensibilità dei metodi per la determinazione del TT e dell'SHBG</li> </ol>
Calcolo usando algoritmi basati sulla legge di azione di massa (richiede la concentrazione di TT, SHBG ed, in alcuni casi, albumina, e la Kd tra T ed SHBG ed albumina)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Semplice</li> <li>2) Eccellente correlazione con i metodi che prevedono una separazione fisica</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Molto influenzati dalla accuratezza e dalla sensibilità dei metodi per la determinazione del TT e dell'SHBG</li> <li>2) Dipendono da costanti della legge di azione di massa e da intervalli di riferimento non standardizzate</li> </ol>
Calcolo usando equazioni empiriche	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Eccellente correlazione con i metodi che prevedono una separazione fisica</li> <li>2) Relativamente sensibile</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Le equazioni sono derivate da modellizzazioni derivate dalla concentrazione di TT, SHBG e TL di singoli laboratori</li> <li>2) Sono necessari da centinaia a migliaia di campioni per generare le equazioni</li> <li>3) Le equazioni non sono trasferibili tra i laboratori</li> </ol>

Van Uytvanghe et al. che hanno associato l'ultrafiltrazione associata con la gas cromatografia a diluizione isotopica- MS<sup>18</sup>. La correlazione con i metodi indiretti in dialisi è risultata buona ma non eccellente mantenendo aperto il dibattito circa la tecnica metrologicamente più corretta per questo tipo di analisi. Va notato che il metodo messo a punto non raggiunge una sensibilità sufficiente a misurare la concentrazione di testosterone nelle femmine. Gli estensori del Position Statement della Endocrine Society non hanno individuato altri lavori in cui il testosterone sia stato misurato dopo dialisi con

tecniche diverse da quelle dell'analogo.

Lamentano anche la grande imprecisione, e confusione terminologica di alcuni articoli pubblicati anche da giornali autorevoli. In qualche caso sono considerati metodi diretti per la determinazione del testosterone libero quelli per la determinazione del Free Androgen Index (FAI); in altri il FAI, privo di unità di misura, in quanto un rapporto, è espresso in nmol/L<sup>19</sup>.

### **Determinazione del T biodisponibile (Bio-T)**

Il Bio-T, la somma del T legato all'albumina e di

$$TT = \frac{Ks * [SHBG] * FT}{1 + (Ks * FT) + \frac{Ka * [Alb] * FT}{1 + (Ka * FT)}} + FT$$

TT = Testosterone Totale (mol/L)  
 Ks = Costante di associazione per il legame T-SHBG (L/mol)  
 Ka = Costante di associazione per il legame T-Albumina (L/mol)  
 SHBG = Concentrazione di SHBG (mol/L)  
 FT = Testosterone libero (mol/L)  
 Alb = Concentrazione di Albumina (mol/L)

**Figura 2.** Equazione per il calcolo del Testosterone libero e biodisponibile.

quello libero, è misurato aggiungendo T triziato al campione e precipitando con ammonio solfato il T triziato legato alla SHBG. Moltiplicando la frazione di T triziato non precipitata per la concentrazione di T misurato con un altro dosaggio si ottiene il Bio-T. Il Bio-T correla bene o molto bene con il TL misurato con la dialisi ad equilibrio ma, nonostante l'apparente semplicità della metodica, rimangono delle differenze rilevanti dei risultati dei diversi metodi e gli algoritmi proposti per ottimizzare i calcoli non possono essere trasferiti da un laboratorio all'altro<sup>20, 21</sup>.

Christ-Crain et al. hanno concluso che il Bio-T era meno attendibile del TT nello screening del deficit di T nel soggetto anziano<sup>22</sup> mentre Giton et al. hanno dimostrato recentemente con uno studio molto approfondito e convincente che il Bio-T misurato mediante precipitazione con ammonio solfato è più attendibile rispetto ai metodi basati su un calcolo. Infatti, il Bio-T calcolato era ben confrontabile con quello misurato mediante precipitazione nel 97% dei soggetti eugonadici ma solo nel 70% dei soggetti ipogonadici<sup>23</sup>. Poiché il 90% delle incongruenze tra la concentrazione di T e quella di Bio-T si verifica nell'ambito di concentrazione tra 6.5 e 13 nmol/L, è stato proposto di limitare la determinazione del Bio-T a questo ambito di concentrazione<sup>24</sup>. Va sottolineato, comunque, che questa area grigia è applicabile solo a quei laboratori che utilizzano i metodi RIA per TT e per SHBG forniti rispettivamente da DSL e DPC ed il metodo proposto da Vermeulen per il calcolo del Bio-T<sup>25</sup>. Nel maschio il T totale predice nel modo migliore la concentrazione di Bio-T in tutti i gruppi di soggetti e di pazienti compresi gli ipogonadici; il Bio-T e gli indici calcolati possono avere una qualche utilità solo nei casi borderline<sup>26</sup>. Più recentemente Dechaud et al.<sup>27</sup> hanno confrontato la concentrazione di Bio-T misurata mediante precipitazione, calcolata con la formula di Vermeulen semplificata in due gruppi di maschi (età inferiore a 35 e superiore a 65 anni). Questo gruppo di Lione ha concluso che, mentre la correlazione tra i due metodi è simile nei due gruppi (rispettivamente  $r = 0.87$  e  $0.88$ ), la ratio Bio-T calcolato/Bio-T misurato era di 2.28 nei soggetti più giovani e 3.48 in quelli più vecchi.

Non vi sono dubbi che le modalità con cui è calcolato il Bio-T negli articoli della letteratura sono spesso poco accurate. La inaccuratezza dei metodi per la determinazione del Bio-T nella diagnostica dell'iperandrogenismo nella femmina è stata dimostrata da Meunier et al. che hanno usato la precipitazione con ammonio solfato e l'analizzatore E170 (Roche) per la determinazione del T<sup>28</sup> e Mueller et al. che ha usato il calcolo ed il metodo radioimmunologico DPC<sup>29</sup>. È interessante rilevare come di rado sia stata proposta la determinazione del Bio-T con analizzatori automatici. Presumibilmente questo è dovuto al fatto che il campione che si ottiene dopo il trattamento consiste in una matrice al 50% di solfato di ammonio con una concentrazione di albumina pari al 50% di quella degli altri campioni. Gli unici autori che si sono cimentati con questo problema hanno ricostituito il precipitato con il tampone di lavoro dell'analizzatore contenente proteine<sup>30</sup>. Il Bio-T può anche essere calcolato una volta che sono stati misurati TT, SHBG ed albumina. La VEQ per il Bio-T del CAP dimostra un CV compreso tra il 30 ed il 40% con valori del 20% più alti per il Bio-T calcolati. Va considerato che la sensibilità di questa tecnica (intorno a 0.5 nmol/L) ne impedisce l'impiego nelle donne e nei bambini.

### Indice degli androgeni liberi (Free Androgen Index, FAI)

Il FAI è il rapporto (quindi privo di unità di misura) tra T ed SHBG e dipende quindi dalla accuratezza e dalla affidabilità delle due determinazioni ed in particolare del T. Questo indice assume una relazione lineare, che non esiste, tra TL (come FAI) e TT e l'indice non tiene in considerazione l'influenza dell'albumina e di altre proteine a cui si lega il T<sup>31</sup>. Nonostante una discreta correlazione con il Bio-T ( $r = 0.89$ ), il FAI non rappresenta un indice utile. Il rapporto FAI/Bio-T è correlato negativamente ( $r = -0.86$ ) con l'SHBG è sovrastima grossolanamente il contributo della capacità legante dell'SHBG ad una stima affidabile del T non legato all'SHBG<sup>32</sup>.

### Calcolo della concentrazione di Testosterone libero

La concentrazione di T che è libero o è legato all'SHBG o all'albumina può essere calcolata con la legge di azione di massa impiegando la costante di dissociazione (Kd) del legame tra SHBG e T ed albumina e T. La concentrazione dell'albumina, proteina legante a bassa affinità, cambia troppo poco per influenzare significativamente la concentrazione di TL e la Kd dell'SHBG-T è intorno a 1 nmol. Vermeulen ha proposto una equazione (Fig. 2) che incorpora la concentrazione di albumina ed SHBG che è tra le più usate<sup>25</sup> anche se il valore della Ks per il T-SHBG usata nell'equazione è stata al centro di accesi dibattiti e sono state proposte altre costanti di affinità molto differenti

(fino ad un fattore di 4) e l'adozione di valore piuttosto che un altro modifica molto il valore del calcolo del TL. Non è infine chiaro se la costante di affinità si modifica con l'età<sup>25</sup>. Il valore calcolato, che può essere facilmente ottenuto impiegando uno dei calcolatori disponibili in rete<sup>33</sup> è molto ben comparabile con la concentrazione di TL misurata in dialisi simmetrica<sup>34,35</sup>. Miller et al. hanno confrontato con la Dialisi simmetrica 441 campioni provenienti da 141 soggetti studiati tre volte in un mese divisi in quattro gruppi (donne con mestruazioni regolari-estrogeni/T positive, donne con più di 50 anni non in terapia sostitutiva-estrogeni negativi/T positive, donne con più di 50 anni in terapia sostitutiva-estrogeni positive/T negative, donne con ipopituitarismo-estrogeni/T negative). Il coefficiente di correlazione tra dialisi simmetrica e calcolo era di 0.99 con un'intercetta non diversa da zero ed una pendenza del 20% (non è chiaro se dipendente da un errore sistematico nel metodo in dialisi simmetrica o nel calcolo). Le formule sono state recentemente confrontate con l'ultracentrifugazione<sup>36</sup>, con la dialisi simmetrica in 30 maschi anziani<sup>37</sup> e con il FAI in 126 maschi eugonadici<sup>38</sup> con buoni risultati. Il metodo in dialisi è sicuramente impegnativo e richiede, tra l'altro, un controllo molto preciso della temperatura (se la temperatura del campione aumenta, aumenta la percentuale del T non legato) ed una accurata manutenzione delle celle di dialisi. Meno del 5% dei soggetti presenta una concentrazione di T più bassa del limite inferiore dell'intervallo di riferimento usando il calcolo stechiometrico contro il 5% quando si usa la dialisi ad equilibrio, ed il 55% usando il FAI. Il calcolo del TL risulta utile nella maggior parte delle condizioni, compresa la sindrome dell'ovaio policistico<sup>39</sup>, con l'eccezione della gravidanza.

### **Determinazione diretta del testosterone libero con metodo radioimmunologico competitivo di tipo "analogo"**

La cosiddetta tecnologia dell'analogo è stata proposta molti anni fa per la determinazione degli ormoni tiroidei liberi e, nonostante l'acceso dibattito che ha alimentato, rappresenta oggi il metodo universalmente utilizzato per questo dosaggio. Alla fine degli anni 80 è stato messo a punto il primo metodo per la determinazione del testosterone libero basato su questo principio. Un campione di siero ed un tracciato isotopico "analogo" (di composizione biochimica sconosciuta e coperta da brevetto) sono cimentati con una provetta rivestita di anticorpo. La molecola "analogo" può competere in condizioni controllate di pH, temperatura e forza ionica con il testosterone libero senza spiazzare l'equilibrio tra il T libero e T legato (ad albumina ed SHBG). L'analogo non deve legarsi ad SHBG, albumina e alle altre proteine leganti contenute nel campione; anche se l'affinità dell'anticorpo per il T è più bassa rispetto a quella dell'SHBG e quindi il dosaggio può misurare la frazione libera influenzando minimamente

l'equilibrio tra T libero e T legato all'SHBG, questo è meno realizzabile per l'albumina che ha una affinità analoga o addirittura inferiore a quella dell'anticorpo. Sin dal momento in cui è stato commercializzata, è stato dimostrata una buona correlazione di questa tecnologia con il metodo della dialisi ad equilibrio anche se i risultati erano di quasi l'80% più bassi di quelli assicurati dalla dialisi ad equilibrio. Risultano di difficile interpretazione le differenze che si ottengono negli esercizi di VEQ impiegando i metodi più usati (DPC e DSL) che arrivano al 100% anche se gli intervalli di riferimento proposti dai due produttori sono molto simili. Il limite superiore dell'intervallo di riferimento proposto da DPC è superiore del 50% di quello descritto in letteratura per la femmina e del 100% di quello descritto per il maschio<sup>16</sup>. L'inserito con cui produttore correda il kit per la determinazione del testosterone libero Coat-A-Count dichiara peraltro non solo un coefficiente di determinazione molto basso ( $r = 0.45$ ) ma anche un intercetta nelle femmine di 34 pmol/L<sup>16</sup> e, secondo il produttore, il kit può essere usato esclusivamente nella femmina. Un esame, anche sommario, della letteratura fornisce dei risultati scoraggianti. Winters et al. che hanno valutato il metodo DPC nel maschio hanno riportato che l'SHBG è un determinante della concentrazione di T totale e di TL (DPC) ma non del Bio-T<sup>40</sup>. La correlazione del T Totale e di quello libero è risultata quasi perfetta con una percentuale del libero intorno allo 0.50-0.65% del totale. Questo comporta che in condizioni come l'obesità, il diabete di tipo 2 e l'ipotiroidismo, che possono presentare disfunzioni sessuali, presentano anche basse concentrazioni di SHBG e di testosterone libero (analogo) con possibili misdiagnosi. Viceversa, soggetti con ipogonadismo ed un aumento di SHBG possono presentare un T totale e libero all'interno dell'intervallo di riferimento. La percentuale del T libero misurata per calcolo, dialisi all'equilibrio o ultrafiltrazione è stata stimata intorno allo 1.5-4%.

In conclusione, non sorprende quindi che numerosi autori abbiano criticato la tecnica dell'analogo<sup>41-44</sup>.

### **Uso clinico dei dosaggi di testosterone**

*Maschio.* La maggior parte dei dosaggi di T totale è in grado di diagnosticare l'ipogonadismo nel maschio mentre non è in grado di valutare se il lieve calo che si verifica con l'età rientra nei limiti fisiologici. Il TL calcolato può risultare utile per chiarire valori di TT ai limiti inferiori dell'intervallo di riferimento.

Una concentrazione di T totale maggiore di 320 ng/dL (11.1 nmol/L) è considerata "normale", valori inferiori a 200 ng/dL (6.9 nmol/L) sono diagnostici di ipogonadismo con un'area grigia compresa tra 200 e 320 ng/dL (6.9-11.1 nmol/L). E' da rilevare che la concordanza tra le diverse piattaforme in questa area è modesta rendendo consigliabile, considerata anche la secrezione pulsatile del testosterone, raccogliere cam-



pioni multipli e determinare eventualmente il TL o il Bio-T prima di prendere decisioni terapeutiche. Si deve inoltre tenere presente che la scarsa accuratezza della determinazione del T totale limita anche quella degli esami derivati come il TL ed il Bio-T.

*Femmina.* La maggior parte dei dosaggi di T totale è in grado di identificare ma non di quantificare accuratamente l'iperandrogenismo severo ma non quello moderato come quello della sindrome dell'ovaio policistico. Il TL calcolato correla meglio del T totale con il quadro clinico e risulta aumentato nel 60-70% dei casi. Nonostante qualche sporadica segnalazione preliminare circa il significato clinico degli ipoandrogenismi nella femmina gli attuali dosaggi non sono utili in questo contesto. Il TL può risultare utile per chiarire valori di TT ai limiti inferiori dell'intervallo di riferimento. I metodi automatici non sono in grado di misurare accuratamente il T e si deve ricorrere a metodi che prevedono una estrazione e metodi cromatografici. Nella femmina, il T non è regolato dal feedback delle gonadotropine e gran parte di esso deriva dalla conversione periferica del DEA.

*Bambini.* Dopo il primo anno di vita la concentrazione di T è basso fino alla pubertà causando le stesse difficoltà presentate dalla determinazione del T nella femmina.

## Conclusioni

Non si può che condividere le conclusioni del gruppo di esperti incaricato dalla Endocrine Society. Anche se esiste oggi la tecnologia per una determinazione precisa, accurata e riproducibile del T, i laboratori misurano TT e TL in modo non adeguato (Tab. I).

La raccomandazione principale è quella di sostituire i programmi di VEQ che si limitano a documentare la confrontabilità tra pari dei risultati dei diversi metodi nella determinazione del T con programmi che valutano la capacità dei laboratori di misurare il T in maniera non solo precisa ma accurata. Devono essere inoltre prodotti degli intervalli di riferimento specifici per sesso, età, razza, epoca della pubertà,...

Una raccomandazione di questo genere non può essere implementata in tempi brevi e sono, pertanto, date anche delle raccomandazioni più facili da implementare in tempi brevi dal laboratorio e dal clinico.

1) laboratoristi e clinici devono conoscere il metodo che viene utilizzato e verificare che l'intervallo di riferimento sia stato determinato correttamente. Gli intervalli di riferimento devono essere definiti congiuntamente da laboratoristi e clinici in soggetti ben caratterizzati ed utilizzando metodologie corrette. Il kit commercializzato oggi da DSL per la determinazione del T libero presenta degli intervalli di riferimento (media  $\pm$  1 DS, mediana, limiti estremi della distribuzione) definiti in 48 maschi e 38 femmine (12 in fase follicolare, 9 in fase luteinica, 8 in menopausa e 5 che assumono contraccettivi orali)<sup>45</sup>. L'inserito del

metodo Centaur per il T Totale dichiara che è stato ottenuto confermando con l'analisi di 387 campioni l'intervallo di riferimento (intervallo centrale del 95%) calcolato per l'ACS 180 in 211 maschi di età media di 34 anni (da 19 a 71 anni) ed in 190 femmine di età media di 37 anni (da 15 a 75 anni)<sup>46</sup>.

- 2) I metodi diretti hanno delle prestazioni inadeguate e non devono essere impiegati nelle femmine, nei bambini e nei maschi ipogonadici che devono essere valutati utilizzando metodi con estrazione e cromatografia.
- 3) I metodi di dosaggio per il testosterone possono dare dei risultati diversi nei soggetti di controllo e nei soggetti ipogonadici a causa del *milieu* endocrinologico del singolo soggetto.
- 4) Lo screening per l'ipogonadismo si deve basare su prelievi multipli eseguiti al mattino e la maggior parte dei metodi (anche se non tutti) sono in grado di discriminare ipogonadismo da eugonadismo.
- 5) Il campione più adatto allo screening dei tumori androgeno-secerenti nella femmina è quello raccolto nella prima parte della fase follicolare.
- 6) Il T libero, calcolato usando un metodo per la determinazione del T totale di buona qualità e un metodo per la determinazione dell'SHBG con un intervallo di riferimento adeguato, è il metodo più utile e più sensibile per la diagnosi di iperandrogenismo nella femmina.
- 7) Gli intervalli di riferimento nel bambino devono essere specifici per età, sesso e per metodo impiegato (dato che metodi diversi possono fornire risultati molto diversi). Il TL è poco utile in età pediatrica.

L'articolo è stato ripreso da Endocrinews del febbraio 2007<sup>2</sup> e si fa fatica a non condividere il commento di uno dei massimi esperti di testosterone, William Rosner della Columbia University e del St Luke/Roosevelt Hospital Center's Department of Medicine di New York: "Il re è nudo. Tutti sanno che i dosaggi di testosterone non misurano quello che dovrebbero, ma nessuno vuole dirlo esplicitamente". Dopo 30 anni di frammentazione della diagnostica endocrinologia si è finalmente (!) ottenuto che tutti i laboratori dispongono del loro metodo per il dosaggio del Testosterone. Purtroppo, quasi tutti producono risultati non corretti. Quanti laboratoristi presentano nel loro manuale degli esami i metodi raccomandati, perché ineccepibili dal punto di vista tecnologico, per la determinazione del testosterone (come fanno oggi Quest ed Arup<sup>47-49</sup>)?

L'edizione del 2005 del più famoso volume dedicato agli Intervalli di riferimento in età pediatrica presenta dei dati che risalgono agli anni settanta e a metodi che oramai non esistono più da molti anni<sup>50</sup>. Rosner et al. hanno concluso lo Statement con l'augurio che nasca un movimento per il miglioramento e la standardizzazione del dosaggio del testosterone totale e libero ed hanno aggiunto "Non sarà né facile, né semplice, né rapido correggere la situazione ma l'*intelligenza* e

la professionalità di laboratoristi e clinici devono correggere il problema perché deve essere corretto”.

Auguriamo a noi stessi un buon lavoro!\*

\* Gli aspetti analitici della determinazione del T sono stati recentemente oggetto di ulteriori articoli:

- I) Moal V, Mathieu E, Reynier P, Malhiéry Y, Gallois Y. Low testosterone by liquid chromatography-tandem spectrometry comparison with five immunoassay techniques. *Clin Chimica Acta* 2007 (doi:10.1016/j.cca.2007.07.013; data di consultazione: 5.8.2007).
- II) Vicente FB, Smith FA, Sierra R, Wang S. Measurement of serum testosterone using high-performance liquid chromatography/tandem spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:70-5.
- III) Guo T, Taylor RL, Singh RJ, Soldin SJ. Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution chromatography-photospray ionization tandem spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006; 372:76-82.

## Bibliografia

1. 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.
2. Kristiansen C. Testosterone assays must be improved. *Endocrinol News* 2007; 2: 12-4.
3. Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot MC, Mathieu E, Queyrel N, et al. Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin Chem* 2003; 49:1381-95.
4. Wang C, Catlin DH, Demers LM, Starcevic B, Swerdloff RS. Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:534-43.
5. Herold DA, Fitzgerald RL. Immunoassays for Testosterone in Women: Better than a Guess? *Clin Chem* 2003; 49: 1250-1.
6. Matsumoto AM, Bremner WJ. Serum testosterone assays-accuracy matters. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:520-4.
7. Sacks SS. Are Routine Testosterone Assays Good Enough? *Clin Biochem Rev* 2005; 26: 43-5.
8. Fitzgerald RL, Herold DA. Serum total testosterone: immunoassay compared with negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 1996; 42: 749-55.
9. Cawood ML, Field HP, Ford CG, Gillingwater S, Kicman A, Cowan D, et al. Testosterone measurement by Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: validation of a method for routine clinical practice. *Clin Chem* 2005; 51: 1472-9.
10. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Pattison EG, Bunker AM, Robert L et al. Performance characteristics of a novel tandem Mass Spectrometry assay for serum Testosterone. *Clin Chem* 2006; 52: 120-8.
11. Gallagher LM, Owen LJ, Keevil BG. Simultaneous determination of androstenedione and testosterone in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: validation of a method for routine clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 48-56.
12. Diver MJ. Analytical and physiological factors affecting the interpretation of serum testosterone concentration in men. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 3-12.
13. Kane J, Middle J, Cawood M. Measurement of serum testosterone in women; what should we do? *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 5-15.
14. Warner MH, Kane J, Atkin SL, Kilpatrick ES. Dehydroepiandrosterone sulphate interferes with the Abbott Architect direct immunoassay for testosterone. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 196-9.
15. Middle JG. Dehydroepiandrosterone sulphate interferes in many direct immunoassays for testosterone. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 173-7.
16. Lepage R. Measurement of testosterone and its sub-fractions in Canada. *Clin Biochem* 2006; 39: 97-108.
17. Wheeler MJ. The determination of bio-available testosterone. *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 345-57.
18. Van Uytvanghe K, Stockl D, Kaufman JM, Fiers T, Ross HA, De Leenheer AP, et al. Evaluation of a candidate reference measurement procedure for serum free testosterone based on ultrafiltration and isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 2004; 50: 2101-10.
19. Sutton-Tyrrell K, Wildman RP, Matthews KA, Chae C, Lasley BL, Brockwell S, et al. Sex hormone binding globulin and the free androgen index are related to cardiovascular risk factors in multiethnic premenopausal and perimenopausal women enrolled in the Study of Women Across the Nation (SWAN). *Circulation* 2005; 111:1242-9.
20. Emadi-Konjin P, Bain J, Bromberg IL. Evaluation of an algorithm for calculation of serum “bioavailable” testosterone (BAT). *Clin Biochem* 2003 36:591-6.
21. De Ronde W, Van der Schouw YT, Pols HAP, Gooren LJG, Muller M, Grobde DE, et al. Serum bioavailable testosterone: assayed or calculated? *Clin Chem* 2006; 52: 1777-84.
22. Christ-Crain M, Meiera C, Huber P, Zimmerli I, Trummer M, Müller B. Comparison of different methods for the measurement of serum testosterone in the aging male. *Swiss Med Wkly* 2004; 134: 193-7.
23. Giton F, Fiet J, Guéchet J, Ibrahim F, Bronsard F, Chopin D, et al. Serum bioavailable testosterone: assayed or calculated? *Clin Chem* 2006; 52: 474-81.
24. Gheorghiu I, Moshyk A, Lepage R, Ahnadi CE, Grant AM. When is bioavailable testosterone a redundant test in the diagnosis of hypogonadism in men? *Clin Biochem* 2005; 38: 813-8.
25. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3666-72.
26. Morris PD, Malkin CJ, Channer KS, Jones TH. A mathematical comparison of techniques to predict biologically available testosterone in a cohort of 1072 men. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 241-9.
27. Dechaud H, Denuziere A, Rinaldi S, Bocquet J, Lejeune H, Pugeat M. Age-associated discrepancy between measured and calculated bioavailable testosterone in men. *Clin Chem* 2007;53:723-8.
28. Meunier JC. Détermination de la testostérone biodisponible dans le diagnostic de l'hyperandrogénisme féminin.

- Immuno-analyse & Biologie spécialisée 2005; 20: 96-102.
29. Mueller A, Dittrich R, Cupisti S, Beckmann MW, Binder H. Is it necessary to measure free testosterone to assess hyperandrogenemia in women? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114: 182-7.
  30. Davies R, Collier C, Raymond M, Heaton J, Clark A. Indirect measurement of bioavailable testosterone with the Bayer Immuno 1 system. *Clin Chem* 2002; 48: 388-90.
  31. Lepage R. Testosterone Total, Free, or Bioavailable: What Should Labs Report? *Clin Lab news* 2006; 32(8): 12-4.
  32. Meunier JC. Testostérone libre ou biodisponible: dosages ou calculs. Comparaison critique de différents modes d'approche. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 2005; 20: 65-77.
  33. <http://www.issam.ch/freetesto.htm> (data di consultazione: 30.7.2007).
  34. Miller KK, Rosner W, Lee H, Hier J, Sesmilo G, Schoenfeld D, et al. Measurement of free testosterone in normal women and women with androgen deficiency: comparison of methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:525-33.
  35. Rinaldi S, Geay A, Dechaud H, Biessy C, Zeleniuch-Jacquotte A, Akhmedkhanov A, et al. Validity of free testosterone and free estradiol determinations in serum samples from postmenopausal women by theoretical calculations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1065-71.
  36. Ly LP, Handelsman DJ. Empirical estimation of free testosterone from testosterone and sex hormone-binding globulin immunoassays. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 471-8.
  37. Ross HA, Meuleman EJ, Sweep FCGJ. A simple method for estimating equilibrium constants for serum testosterone binding resulting in an optimal free testosterone index for use in elderly men. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43:613-6.
  38. Ho CKM, Stoddart M, Walton M, Anderson RA, Beckett GJ. Calculated free testosterone in men: comparison of four equations and with free androgen index. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 389-97.
  39. Hahn S, Kuehnelt W, Tan S, Kramer K, Schmidt M, Roessler S, et al. Diagnostic value of calculated testosterone indices in the assessment of polycystic ovary syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 202-7.
  40. Winters SJ, Kelley DE, Goodpaster B. The analog free testosterone assay: are the results in men clinically useful? *Clin Chem* 1998; 44: 2178-82.
  41. Rosner W. An extraordinarily inaccurate assay for free testosterone is still with us. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2903.
  42. Gruschke A, Herbert Kuhl H. Validity of radioimmunological methods for determining free testosterone in serum. *Fertil Steril* 2001;76:576-82.
  43. Van Uytendanghe K, Stockl D, Kaufman JM, Fiers T, De Leenheer A, Thienpont LM. Validation of 5 routine assays for serum free testosterone with a candidate reference measurement procedure based on ultrafiltration and isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005; 38: 253-61.
  44. Morley JE, Patrick P, Perry III HM. Evaluation of Assays Available to Measure Free Testosterone. *Metabolism* 2002; 51: 975-82.
  45. DSL. Active Free testosterone RIA.DSL-4900. Webster, TX, USA Rev 28-04-2005.
  46. Siemens-Bayer. Testosterone.111754 Rev.H, 2003-4.
  47. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry <http://www.nicholsinstitute.com/Endocrinology/Testosterone%20Sheet5.pdf> (data di consultazione: 22.7.2007).
  48. Testosterone Free, Females or Children <http://www.aruplab.com/guides/ug/tests/0081059.jsp> (data di consultazione: 22.7.2007).
  49. Testosterone, Females or Children <http://www.aruplab.com/guides/ug/tests/0081058.jsp> (data di consultazione: 22.7.2007).
  50. Soldin S, Bruignara C, Wong EC, eds. Pediatric reference Intervals. 5<sup>th</sup> ed. Washington: ACC Press; 2005.