

IL POSITION STATEMENT 2007 DELL'ENDOCRINE SOCIETY SU UTILITÀ, LIMITI E PROBLEMI DELLA DETERMINAZIONE DEL TESTOSTERONE TOTALE E LIBERO*

PREMESSA

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, per esempio il testosterone e la Endocrine Society ha incaricato una Task Force costituita da 5 esperti di valutare i metodi di determinazione del testosterone totale (TT) e libero (TL) (1, 2).

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 Verifica Esterna di Qualità (VEQ) più autorevoli come quelli del College of American Pathologists (Tab. I). Anche se gli analizzatori più impiegati sono un numero molto ristretto, la imprecisione con cui si misura il TT è rilevante. Anche se i metodi immunometrici con un intervallo di riferimento adeguato sono in grado di distinguere maschi eugonadici ed ipogonadici, la loro imprecisione ed inaccuratezza ne preclude l'uso nelle femmine e nei bambini (3,4). Nessuno dei metodi automatici è accettabile per la determinazione del TT nella donna ed è stato provocatoriamente affermato che associando la clinica del paziente a numeri prodotti casualmente sono più correlati con la diagnosi dei risultati della determinazione del testosterone (5). I metodi RIA preceduti da una fase di estrazione o cromatografia sono più accurati di quelli automatici solo se la fase preanalitica è monitorata attentamente. Nel Regno Unito, il TL è misurato con un numero sempre più ristretto di analizzatori automatici: il 90% dei risultati relativi al testosterone sono ottenuti con cinque piattaforme analitiche automatizzate (6). 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. I metodi automatici di oggi forniscono delle prestazioni di sensibilità e specificità non migliori di quelle dei metodi manuali degli anni '70. Solo la collaborazione delle industrie del settore, degli enti di normazione, dei professionisti, degli enti di accreditamento e del governo può correggerli (6). 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

Nel maschio circa la metà del T circolante è legato fortemente alla SHBG, circa la metà è legata all'albumina ed 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%. 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 (7). Il concetto di Bio-T (dato dalla somma del TL e di quello legato all'albumina) ha acquisito consensi (8). La Tabella III riassume i pregi ed i difetti dei principali metodi per la determinazione delle frazioni del testosterone.

DETERMINAZIONE DEL TESTOSTERONE LIBERO (TL)

Il metodo di riferimento è considerato quello della dialisi all'equilibrio. I risultati di questa tecnica dipendono dalla accuratezza della determinazione diretta del T e dalla purezza della molecola triziata; 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

La correlazione con i metodi indiretti in dialisi è risultata buona, ma non eccellente mantenendo aperto il dibattito circa la tecnica 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.

DETERMINAZIONE DEL T BIODISPONIBILE (BIO-T)

Il Bio-T 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 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 (9).

INDICE DEGLI ANDROGENI LIBERI (FREE ANDROGEN INDEX, FAI)

Il FAI è il rapporto (privo di unità di misura) tra T ed SHBG e dipende dalla accuratezza e dall'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 (10). Nonostante una discreta correlazione con il Bio-T ($r = 0.89$), il FAI è poco utile. Il rapporto FAI/Bio-T è correlato negativamente ($r = - 0.86$) con l'SHBG e sovrastima grossolanamente il contributo della capacità legante dell'SHBG ad una stima affidabile del T non legato all'SHBG (11).

CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE DI TESTOSTERONE LIBERO

La concentrazione di TL o 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. 1) che incorpora la concentrazione di albumina ed SHBG che è tra le più usate (12). Il valore calcolato, che può essere facilmente ottenuto impiegando uno dei calcolatori disponibili in rete (13) è molto ben comparabile con la concentrazione di TL misurata in dialisi simmetrica (14).

DETERMINAZIONE DIRETTA DEL TESTOSTERONE LIBERO CON METODO RADIOIMMUNOLOGICO COMPETITIVO DI TIPO "ANALOGO"

Tutti i laboratori clinici misurano il testosterone libero con il metodo dell'"analogo". Un campione di siero ed un tracciante isotopico "analogo" (di composizione biochimica sconosciuta e coperta da brevetto) sono cimentati con una provetta rivestita di anticorpo. La molecola "analogo" può competere con il TL senza spiazzare l'equilibrio tra il TL e T legato (ad albumina ed SHBG). Winters et al. hanno riportato una correlazione del TT con il TL (analogo DPC) quasi perfetta con una percentuale del libero intorno allo 0.50-0.65% del totale mentre la percentuale del TL misurata per calcolo, dialisi all'equilibrio ed ultrafiltrazione è stata stimata intorno allo 1.5-4% (15). Il metodo dell'analogo è molto criticato perchè impiega dei reagenti di cui è sconosciuta la natura chimica ed immunologica (16).

USO CLINICO DEI DOSAGGI DI TESTOSTERONE

Maschio. La maggior parte dei metodi per la determinazione del TT 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. Una concentrazione di TT 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. La concordanza tra le diverse piattaforme in questa area è modesta rendendo consigliabile, considerata anche la secrezione pulsatile del testosterone, raccogliere campioni multipli e determinare eventualmente il TL o il Bio-T prima di prendere decisioni terapeutiche

(la scarsa accuratezza della determinazione del TT limita anche quella degli esami derivati).

Femmina. La maggior parte dei dosaggi di TT è in grado di identificare, anche se non di quantificare accuratamente, l'iperandrogenismo severo, ma non quello moderato come quello della sindrome dell'ovaio policistico. Gli attuali dosaggi, nonostante qualche sporadica segnalazione preliminare, non sono utili negli ipoandrogenismi.

Bambini. La concentrazione di T è basso dopo il primo anno di vita 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 per consenso dei risultati dei diversi metodi nella determinazione del T con programmi che valutano la capacità dei laboratori di misurare il T in maniera accurata oltre che precisa. Devono essere inoltre prodotti degli intervalli di riferimento specifici per sesso, età, razza, epoca della pubertà,...

Raccomandazioni di questo genere non possono essere implementate in tempi brevi e sono, pertanto, date indicazioni più facili da implementare in tempi brevi dal laboratorio e dal clinico.

- 1) I laboratoristi e i clinici devono conoscere il metodo che viene utilizzato e verificare che l'intervallo di riferimento sia stato determinato correttamente congiuntamente da laboratoristi e clinici in soggetti ben caratterizzati ed utilizzando metodologie adeguate.
- 2) I metodi diretti hanno delle prestazioni inadeguate e non devono essere impiegati nelle femmine, nei bambini e nei maschi ipogonadici che richiedono 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-secernti nella femmina è quello raccolto nella prima parte della fase follicolare.
- 6) Il TL, calcolato usando un metodo per la determinazione del TT e 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 del TT nel bambino devono essere specifici per età, sesso e per metodo impiegato. Il TL è poco utile in età pediatrica.

Si fa fatica a non condividere il commento ripreso da Endocrinews del febbraio 2007 (2) 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 laboratori presentano nel loro manuale degli esami i metodi raccomandati, perché ineccepibili dal punto di visto tecnologico, per la determinazione del testosterone (come fanno oggi i più importanti laboratori di riferimento nordamericani come Arup (17-18)? 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 (19). Rosner et al. hanno concluso lo Statement con l'augurio che nasca un movimento per il miglioramento e la standardizzazione del dosaggio del TT e del TL 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" (1).

COMMENTO RELATIVO ALLA SITUAZIONE ITALIANA

La globalizzazione del mercato dei diagnostici comporta che anche in Italia la situazione descritta dall'Endocrine Society sia molto simile. La Fig.2 riassume i risultati di uno degli esercizi più recenti del principale programma di VEQ italiano per il TT e dimostra come tutti i principali metodi usati negli USA trovino impiego anche nel nostro paese. Il mercato italiano risulta ancora più frammentato: se negli USA le quattro aziende principali (Siemens-Centaur, Beckman-Access/ DxI, Siemens, DPC e Roche) forniscono i reagenti all'82% dei laboratori, in Italia le quattro aziende principali (Biomeriuex Vidas, Siemens-Centaur, Siemens-DPC e Roche) li forniscono solo al 58% ed il metodo più usato (VIDAS) non è rappresentato negli USA. Va rilevata, comunque, la grande dispersione dei risultati; solo 10 su 15 laboratori danno un valore medio della concentrazione di testosterone con un bias compreso tra + e -20%; la media del metodo più usato nel nostro paese è pari al 60% e vi sono comunque dei metodi con valori pari al 160%.

Il Position Statement dell'Endocrine Society affronta con forza e con chiarezza un problema serio, a noi trovare la risposta.

Auguriamo a noi stessi un buon lavoro!

*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

Bibliografia Essenziale

- 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) Kane J, Middle J, Cawood M. Measurement of serum testosterone in women; what should we do? *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 5-15.
- 7) Lepage R. Measurement of testosterone and its sub-fractions in Canada. *Clin Biochem* 2006; 39: 97-108.
- 8) Wheeler MJ. The determination of bio-available testosterone. *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 345-57.
- 9) Emadi-Konjin P, Bain J, Bromberg IL. Evaluation of an algorithm for calculation of serum "bioavailable" testosterone (BAT). *Clin Biochem* 2003; 36:591-596.
- 10) Lepage R. Testosterone Total, Free, or Bioavailable: What Should Labs Report? *Clin Lab News* 2006 ; 32(8): 12-4.
- 11) Meunier JC. Testostérone libre ou biodisponible: dosages ou calculs. Comparaison critique de différents modes d'approche. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 2005 ; 20: 65-77.
- 12) 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.
- 13) <http://www.issam.ch/freetesto.htm> (data di consultazione: 30.8.2007).
- 14) Miller KK, Rosner W, Lee H, Hier J, Sessmilo 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.
- 15) Winters SJ, Kelley DE, Goodpaster B. The analog free testosterone assay: are the results in men clinically useful? *Clin Chem* 1998; 44: 2178-82.
- 16) Rosner W. An extraordinarily inaccurate assay for free testosterone is still with us. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2903.
- 17) Testosterone Free, Females or Children <http://www.aruplab.com/guides/ug/tests/0081059.jsp> (data di consultazione: 17.01.2008).
- 18) Testosterone, Females or Children <http://www.aruplab.com/guides/ug/tests/0081058.jsp> (data di consultazione: 17.01.2008).
- 19) Soldin S, Brugnara C, Wong EC, eds. *Pediatric reference Intervals*. 5th ed. Washington: ACC Press; 2005.
- 20) <http://eqas.ifc.cnr.it> (data consultazione: 17.01.2008) 15) Davis S.R., Davison S.L., Donath S., Bell R. Relationship between circulating androgen levels and self-reported sexual function in women. *JAMA* 2005; 294: 91-96.

Tabella I. Risultati del programma di 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

Analizzatore	Laboratori	Media/DS (ng/dL)	CV (%)	Valori estremi
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

Analizzatore	Laboratori	Media/DS (ng/dL)	CV (%)	Valori estremi
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

Analizzatore	Laboratori	Media/DS (ng/dL)	CV (%)	Valori estremi
Bayer ACS: 180/Centaur	381	424.1/42.6	10.0	328-549
Beckman Access2/ UniCel Dxl	209	402.3/21.6	5.4	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>	464.9/80.6	17.3	276-744

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"> 1) Semplici, rapidi e poco costosi 2) Produttività elevata 3) Automatizzabile 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Frequente sovrastima del T 2) Sensibile all'effetto matrice 3) Poco standardizzati 4) Scarsa accuratezza con T < 300 ng/dL 5) Scarsa qualità degli intervalli di riferimento 6) Rifiuti radioattivi (RIA)
RIA dopo estrazione cromatografica	<ol style="list-style-type: none"> 1) Molta esperienza: intervalli di riferimento in popolazioni diverse disponibili 2) L'impiego di volumi rilevanti aumenta la sensibilità 3) Consente la misurazione di numerosi steroidi separati nella corsa cromatografica 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Dosaggio impegnativo, complesso e costoso 2) Richiede elevata competenza tecnica 3) Richiede l'uso di solventi organici da smaltire in modo idoneo 4) Suscettibili all'effetto matrice 5) La precisione del recupero delle fasi estrattive deve essere monitorata attentamente 6) Produce rifiuti radioattivi
MS dopo estrazione e cromatografia liquida o gassosa	<ol style="list-style-type: none"> 1) Nella stessa corsa cromatografica possono essere misurati molti steroidi 2) Può essere ottenuta una elevata accuratezza 3) Produttività comparabile ai metodi RIA preceduta da estrazione e cromatografia 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Costosa 2) Poco standardizzata 3) Produttività limitata 4) Le fasi di derivatizzazione possono introdurre errori 5) L'impiego di solventi organici richiede attrezzature idonee particolari

*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

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).

Metodo	Pregi	Difetti
RIA diretti	<ol style="list-style-type: none"> 1) Semplici, rapidi e relativamente poco costosi 2) Richiedono competenza tecnica minima 3) Automatizzabile 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Accuratezza, sensibilità e comparabilità inter-laboratori scarsa soprattutto a causa di: <ul style="list-style-type: none"> - significativo legame dell'analogo alle proteine del siero - mancanza di parallelismo nelle diluizioni seriali
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"> 1) Accurato (la dialisi all'equilibrio è considerato il metodo di riferimento) 2) Relativamente sensibile e riproducibile 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Relativamente costoso 2) Richiede elevata competenza tecnica <ul style="list-style-type: none"> - La dialisi ad equilibrio è influenzata dalla diluizione del campione - L'ultrafiltrazione dipende dall'adsorbimento del T alla membrana e dal controllo preciso della temperatura - Dialisi ed ultra-centrifugazione risentono molto di impurezze triziate legate da SHBG e/o albumina in maniera diversa dal T 3) Dipende dall'accuratezza del metodo per il T 4) Non sufficientemente sensibile per misurare il TL nella femmina e nel bambino
Bio-T misurato dopo precipitazione con ammonio solfato	Tecnicamente semplice	<p>Può essere inaccurato per:</p> <ul style="list-style-type: none"> - uso di T triziato con impurezze - precipitazione incompleta delle globuline - metodologie non uniformi dei diversi laboratori

<p>Calcolo del FAI (T/SHBG)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Semplice 2) Buona correlazione con le determinazioni con separazione fisica nelle donne 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Scarsa correlazione con la misura di separazione fisica nei maschi 2) Fortemente dipendenti dalla accuratezza e dalla sensibilità dei metodi per la determinazione del TT e dell'SHBG
<p>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)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Semplice 2) Eccellente correlazione con le determinazioni con separazione fisica 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Molto influenzati dalla accuratezza e dalla sensibilità dei metodi per la determinazione del TT e dell'SHBG 2) Assunzioni relative alle legge di azione di massa ed intervalli di riferimento non standardizzate
<p>Calcolo usando equazioni empiriche</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Eccellente correlazione con i metodi che prevedono la separazione fisica 2) Relativamente sensibile 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Le equazioni sono derivate da modellizzazioni derivate dalla concentrazione di T, SHBG e TL di singoli laboratori 2) Sono necessari da centinaia a migliaia di campioni per generare le equazioni 3) Le equazioni non sono trasferibili tra i laboratori

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

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 1. Equazione per il calcolo del Testosterone libero e biodisponibile.

Metodo	Laboratori	Outlier	Media	% vs consenso	CV%	Min	Max
VIDAS	123	3	1.48	63.5	12	1.06	2
CENTAUR	98	3	2.35	100.9	11.3	1.75	3.04
ELECSYS	57	2	2.3	98.7	10	1.84	2.88
IMMULITE 2000	57	3	2.07	88.8	9.4	1.64	2.65
ARCHITECT	51	2	3.29	141.2	7.5	2.86	4.02
MODULAR	47	1	2.5	107.3	7.6	2.04	2.89
ACCESS	41	1	2.35	100.9	7.2	2.05	2.74
AIA	33	1	2.08	89.3	11.4	1.52	2.6
AXSYM	21	0	1.63	70.0	17.1	1.13	2.25
IMT	17	1	2.61	112.0	11.9	2.16	3.06
IMMULITE	11	0	1.93	82.8	13.9	1.5	2.31
CIS	10	1	1.83	78.5	14.2	1.6	2.38
LIAISON	6	0	3.85	165.2	7.7	3.5	4.4
ROCHE	6	0	2.38	102.1	7.9	2.21	2.69
ACS	5	0	2.58	110.7	18.6	2.15	3.3
CONSENSUS	613	11	2.3	100.0	26	0.9	3.8

Figura 2. Principali metodi utilizzati dai laboratori che misurano il TT in Italia e partecipano ad un programma di VEQ (CV = Coefficiente di variazione) (Da rif. 20 modificato).