Testosterone Totale e Free Testosterone: Definizione e Metodi di Valutazione

Solo una minima parte del Testosterone (circa il 2-3%) circola nel sangue in forma libera (ovvero non legata a proteine plasmatiche); per contro circa il 60% circola legato specificamente e con alta affinità alla SHBG (Sex-Hormone Binding Globulin) e circa il 30-40% circola non specificamente e debolmente legato all'Albumina (weakly bound Testosterone).

La frazione di Testosterone legata ad SHBG è biologicamente inattiva, a causa della elevata affinità di legame di questa proteina per il Testosterone; per contro, per valutare l'ormone fisiologicamente attivo per l'ingresso nei tessuti, possono essere usati i test **Free Testosterone** (corrispondente alla frazione libera) o Testosterone Biodisponibile (che include sia la frazione libera che quella debolmente legata all'Albumina).

La misura del Free Testosterone con metodo accurato e preciso (es. Dialisi o Ultrafiltrazione, entrambi abbinati a Spettrometria di massa) consente di valutare efficacemente lo stato androgenico, soprattutto nel sesso femminile.

Tali tecniche sono tuttavia costose, complesse e non possono essere impiegate in routine nel laboratorio clinico, ove si ricorre alternativamente a:

-**determinazione indiretta**, con un calcolo di rapporto tra Testosterone Totale e SHBG (ed eventuale aggiunta dell'Albumina, per valutazione del Testosterone Biodisponibile);

-**determinazione diretta immunometrica**, con metodo del cosiddetto "analogo".

Medical Systems: oltre 30 anni di diagnostica del **Free Testosterone**

Il primo test diretto Free Testosterone RIA è stato prodotto da DPC nel 1984
e approvato dall'FDA (USA) nel 1985

Device Name	Applicant	510(K) Number	Decision Date
Coat-a-count Free Testosterone Kit & Com	Diagnostic Products Corp.	K844423	02/27/1985
Pantex Fte Free Testosterone Radioimmuno	Pantex, Div. Bio-analysis, Inc.	K862483	01/14/1987
Active Free Testosterone Ria	Diagnostic Systems Laboratories, Inc.	K952281	07/17/1995
Free Testosterone Enzyme Immunoassay, Mo	Diagnostic Systems Laboratories, Inc.	K001086	05/18/2000
Free Testosterone Enzymeimmunoassay (Eia	Diagnostics Biochem Canada, Inc.	K030730	08/18/2003

Testosterone, Inadeguatezza dei test **Totale e Free**

3° Convegno di Immunometria del Sud Italia
Ipertensione e Monitoraggio della Funzionalità Riproduttiva
Bari – 25 marzo 2011

ELAS Italia
European Ligand Assay Society

Dosaggio del Testosterone libero e totale: problematiche analitiche

Antonio Fortunato
Ospedale "San Bortolo" - Vicenza
antonio.fortunato@ulssvicenza.it

Testosterone Totale e Free

Conclusioni

Le metodiche di dosaggio attualmente utilizzate per la misurazione del testosterone totale e libero sono inadeguate, come ribadito e sottolineato dal Position Statement dell'Endocrine Society

Testosterone, Inadeguatezza dei test **Totale e Free**

Toward Excellence in Testosterone Testing: A Consensus Statement

William Rosner and Hubert Vesper, on behalf of The Endocrine Society and the endorsing organizations*

... Nelle misure derivanti dai metodi di Testosterone sono molto diffuse inaccuratezza e notevoli discrepanze, soprattutto nei bassi intervalli critici di concentrazione, come ad esempio quelli osservati nelle donne, nei bambini e in uomini affetti da ipogonadismo.

L'Endocrine Society ha pubblicato una dichiarazione (Position statement, J Clin Endo Metab 2007) che riassume l'evidenza di queste carenze, raccomandando l'utilizzo di test accurati e la taratura di tutti i metodi per il Testosterone con tracciabilità nei confronti di un solo materiale di riferimento di alto livello metrologico.

I problemi riguardano il processo di misura: questioni specifiche sono la mancanza di accuratezza, specificità, sensibilità e precisione/ripetibilità, soprattutto a basse concentrazioni. Ricercatori e clinici hanno chiesto la standardizzazione dei metodi di misura. **Infatti, benché siano migliorati i metodi per la misura nel siero o plasma, non esiste una preparazione standard per validare l'accuratezza di questi test: di conseguenza, molti test ampiamente utilizzati non offrono risultati accurati per tutto l'intervallo di concentrazioni di Testosterone applicabili alla cura del paziente.** Inoltre, gli intervalli di riferimento attualmente utilizzati variano ampiamente a seconda del dosaggio e della popolazione usata per stabilire gli intervalli, complicando ulteriormente l'interpretazione dei risultati…

J Clin Endocrinol Metab 95: 4542–4548, 2010)

Testosterone, Inadeguatezza dei test **Totale e Free**

POSITION STATEMENT: Utility, Limitations, and Pitfalls in Measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement

William Rosner, Richard J. Auchus, Ricardo Azziz, Patrick M. Sluss, and Hershel Raff

… Calcolo della concentrazione di Free Testosterone

Per calcolare le concentrazioni di Testosterone che sono libere o legate a SHBG ed albumina si può anche usare la legge di azione di massa. Il Calcolo dipende dalla misura di Testosterone Totale, SHBG, albumina e dall'uso delle costanti di dissociazione (Kd) di equilibrio per il legame di Testosterone Totale all'SHBG e di Testosterone Totale all'albumina. Entro limiti piuttosto ampi, la concentrazione di albumina, la proteina a più bassa affinità di legame, varia troppo poco per incidere in maniera significativa sui livelli di Free Testosterone. Benché la Kd per Testosterone Totale-SHBG è di circa 1 nM, questo numero deve essere verificato e universalmente concordato. Inoltre, non è stato concordato uno standard universale per l'SHBG. Con queste precisazioni, il **Calcolo del Free Testosterone è la stima più utile di Testosterone Libero nel siero o plasma**, tranne che in gravidanza…

the College of American Pathologists, and the clinical and laboratory experiences of the participants.

that influence serum testosterone concentration. (*J Clin Endocrinol Metab* 92: 405–413, 2007)

Testosterone, Inadeguatezza dei test **Totale e Free**

POSITION STATEMENT: Utility, Limitations, and Pitfalls in Measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement

William Rosner, Richard J. Auchus, Ricardo Azziz, Patrick M. Sluss, and Hershel Raff

… Il Calcolo del Free Testosterone è straordinariamente comparabile con il Free Testosterone misurato con metodo di Dialisi all'Equilibrio.

Miller et al. hanno confrontato il Calcolo del Free Testosterone con Dialisi all'Equilibrio in oltre 400 donne con una varietà di disturbi ed hanno valutato cinque sottogruppi clinici. I coefficienti di correlazione tra Dialisi all'Equilibrio e Free Testosterone Calcolato erano superiori 0,96; le intercette non erano diverse da zero, ma le pendenze indicavano un bias del 20% tra i valori misurati e calcolati, per un errore sistematico nel metodo di Testosterone Totale utilizzato per il metodo di Dialisi all'Equilibrio oppure per il Calcolo.

D'altra parte, un errore nel Calcolo del Free Testosterone potrebbe derivare dall'uso di un Kd sbagliato, da errori nella misura di SHBG, o da entrambi: non sempre gli studi che confrontano il Calcolo con il metodo di Ultrafiltrazione mostrano una eccellente correlazione.

the College of American Pathologists, and the clinical and laboratory experiences of the participants.

that influence serum testosterone concentration. (*J Clin Endocrinol Metab* 92: 405–413, 2007)

Testosterone, Inadeguatezza dei test **Totale e Free**

POSITION STATEMENT: Utility, Limitations, and Pitfalls in Measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement

William Rosner, Richard J. Auchus, Ricardo Azziz, Patrick M. Sluss, and Hershel Raff

Tabella 3. Confronto dei metodi disponibili per la misura di Free Testosterone

Calcolo, Punti di forza:
-semplice
-eccellente correlazione con misure di separazione fisica (Dialisi all'Equilibrio e Ultrafiltrazione)
Calcolo, Carenze:
Molto dipendente da accuratezza e sensibilità dei dosaggi di Testosterone Totale e SHBG

Test RIA diretto, Punti di forza:
-semplice, rapido e relativamente poco costoso
-richiede minima competenza tecnica
-può essere automatizzato (***NOTA: non come nelle moderne piattaforme di automazione...)***
Test RIA diretto, Carenze:
-scarsa accuratezza, sensibilità e comparabilità inter-laboratorio
-notevoli deviazioni dopo diluizione dei campioni di siero
-significativo legame dell'analogo marcato alle proteine del siero
-mancanza di parallelismo tra misure di Free Testosterone e campioni diluiti serialmente

Testosterone, Inadeguatezza dei test **Totale e Free**

www.associazionemediciendocrinologi.it
ame flash
marzo 2008
Responsabile Editoriale AME: Vincenzo Toscano

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)

CONCLUSIONI
Non si può che condividere le conclusione 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).

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).

Free Testosterone, Metodi di Riferimento e RMP

Metodi di Riferimento per il Free Testosterone:

-Dialisi all'Equilibrio o Ultrafiltrazione e dosaggio Testosterone totale con test RIA

-Dialisi all'Equilibrio o Ultrafiltrazione e dosaggio Testosterone totale in Spettrometria di Massa (UF–GC/MS)

-Ultrafiltrazione e dosaggio Testosterone in Spettrometria di Massa e Diluizione isotopica (UF-ID-GC/MS)
(Candidate Reference Measurement Procedure (RMP): Prof. Linda Thienpont, Laboratory of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Belgio)

Bureau International des Poids et Mesures. Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine
JCTLM database: Laboratory medicine and in vitro diagnostics (http://www.bipm.org/jctlm/)

University of Ghent Reference Measurement Procedure (RMP) for Testosterone:

University of Ghent reference measurement procedure for testosterone

Analyte	testosterone
Applicable matrice(s)	lyophilized, fresh, or frozen human serum
Full description of technique(s)	ID/GC/MS
Quantity	Amount-of-substance concentration
Applicable range	0.05 nmol/l to 70 nmol/l
Expected uncertainty (level of confidence 95%)	1.5 % to 3 %
Reference(s)	*Anal. Chem.*, 1994, **66**, 4116-4119 *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1996, **34**, 853-860
JCTLM DB identification number	NRMeth 7

Free Testosterone, Metodi Indiretti di Calcolo

Calcolo del Free Testosterone e/o del Testosterone Biodisponibile:

-Free Androgen Index (FAI), calcolato da immunodosaggio di Testosterone e SHBG e loro rapporto (nmol/L)

-Metodo di calcolo da dosaggio di Testosterone, SHBG e Albumina, con vari algoritmi per costanti di affinità di SHBG e Albumina per il Testosterone (es. Vermeulen, J Clin Endocrinol Metab 84:3666-3672, 1999)

-Calcolatoratori Online, es. ISSAM (International Society for the Study of the Aging Male):
Free & Bioavailable Testosterone calculator (http://www.issam.ch/freetesto.htm)

Free Testosterone, Limiti dei Metodi Indiretti di Calcolo

Da: Dorizzi, RIMeL 2007

Tabella III. Pregi e difetti principali delle tecnologie impiegate per la determinazione del Testosterone libero

RIMeL / ULaM 2007; 3 — 153

Editoriale

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

Metodo	*Pregi*	*Difetti*
Calcolo del FAI (T/SHBG)	1) Semplice 2) Nelle donne buona correlazione con i metodi che prevedono una separazione fisica	1) Scarsa correlazione con la misura di separazione fisica nei maschi 2) Fortemente dipendenti sulla accuratezza e sulla sensibilità dei metodi per la determinazione del TT e dell'SHBG
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)	1) Semplice 2) Eccellente correlazione con i metodi che prevedono una separazione fisica	1) Molto influenzati dalla accuratezza e dalla sensibilità dei metodi per la determinazione del TT e dell'SHBG 2) Dipendono da costanti della legge di azione di massa e da intervalli di riferimento non standardizzate

I risultati dei Metodi Indiretti di Calcolo risentono in grande misura dei limiti di accuratezza e sensibilità dei test utilizzati per il dosaggio di Testosterone Totale e di SHBG

Free Testosterone, Limiti dei Test Immunometrici Diretti

Da: Dorizzi, RIMeL 2007

Tabella III. Pregi e difetti principali delle tecnologie impiegate per la determinazione del Testosterone libero

RIMeL / ULaM 2007; 3 — 153

Editoriale

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

I risultati dei Test RIA Diretti mostrano limiti di accuratezza, sensibilità e comparabilità inter-laboratorio

Metodo	*Pregi*	*Difetti*
RIA diretti	1) Semplici, rapidi e relativamente poco costosi 2) Richiedono competenza tecnica minima 3) Automatizzabile	1) Accuratezza, sensibilità e comparabilità inter-laboratori scarsa soprattutto a causa di: - significativo legame dell'analogo alle proteine del siero - mancanza di parallelismo nelle diluizioni seriali

Free Testosterone, Test Immunometrici Diretti

Test Diretti per il dosaggio del Testosterone Libero:

-Immunodosaggi RIA competitivi con analogo

-Immunodosaggi EIA competitivi con analogo

Limitazioni, da Letteratura:

-NESSUNO DI QUESTI TEST E' UN METODO DI RIFERIMENTO

-TUTTI QUESTI TEST HANNO RISULTATI DIVERSI TRA DIVERSI TEST DEL COMMERCIO

-NESSUNO DI QUESTI TEST HA RISULTATI SOVRAPPONIBILI AI METODI DI RIFERIMENTO

-TUTTI SOTTOSTIMANO DA 2-3 A 9 VOLTE RISPETTO AI TEST DI RIFERIMENTO, A SECONDA DI:

kit del commercio usato
sesso del paziente
condizioni endocrine
terapia

Free Testosterone, Inaffidabilità dei Test Diretti

Aging Male, Early Online: 1–11
© 2015 Informa UK Ltd. DOI: 10.3109/13685538.2015.1004049

ORIGINAL ARTICLE

Recommendations on the diagnosis, treatment and monitoring of hypogonadism in men

Raccomandazione 4: Diagnosi di laboratorio
... I test di laboratorio per confermare la diagnosi di ipogonadismo sono il Testosterone totale e il Free Testosterone nel siero.
... Il Free Testosterone o il Testosterone Biodisponibile vanno considerati quando la concentrazione di Testosterone totale non corrisponde alla presentazione clinica, perché variazioni individuali delle concentrazioni di SHBG possono influenzare i risultati di Testosterone totale. Inoltre, il Free Testosterone o il Testosterone Biodisponibile dovrebbero essere particolarmente considerati negli uomini obesi.

La Dialisi all'equilibrio è il Gold standard per la misurazione del Free Testosterone, ma può non essere normalmente disponibile o potrebbe essere un test troppo costoso.

I test per il Free Testosterone basati su immunodosaggi competitivi con analogo sono ampiamente disponibili e sono stati utilizzati clinicamente con buon successo; tuttavia, la loro affidabilità è stata messa in discussione da alcuni autori.
In alternativa, la misura nel siero di SHBG, insieme ad una misura affidabile di Testosterone totale, consente la determinazione dei livelli di Free Testosterone calcolato.

Free Testo, Inaccuratezza e Sottostima dei Test Diretti

Editoriale

La misura del testosterone: perché continuare a fingere di non sapere?

Antonio Fortunato
Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale "San Bortolo", Vicenza

Test Diretti per il Free Testosterone

Anche la diffusione dei metodi, basati sul principio dell'analogo marcato, per la determinazione del fT dimostrano l'uso nella pratica clinica. William Rosner[8], nel 2001, denuncia come siano ancora in uso metodi diretti per la misura del fT che sono drammaticamente inaccurati e ne sottostimano la concentrazione di 3-5 volte.

La stima indiretta del fT, utilizzando le formule proposte da Vermulen[9] e misurando il TT e l'SHBG con metodi di buona qualità, associata ad un intervallo di riferimento adeguato risulta il sistema più sensibile e clinicamente utile per la diagnosi di iperandrogenismo nella donna[5].

LigandAssay 16 (1) 2011

Free Testosterone, Inaccuratezza e Sottostima Test RIA

0021-972X/01/$03.00/0
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
Vol. 86, No. 6
Printed in U.S.A.
Copyright © 2001 by The Endocrine Society

LETTER TO THE EDITOR

An Extraordinarily Inaccurate Assay for Free Testosterone Is Still with Us

To the editor:

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
Copyright © 2001 by The Endocrine Society

William Rosner
Department of Endocrinology
St. Luke's-Roosevelt Hospital Center
New York, New York 10019

AN EXTRAORDINARILY INACCURATE ASSAY FOR FREE TESTOSTERONE IS STILL WITH US

… Sfogliando il numero di Novembre 2000 del JCEM, ho notato un articolo in cui una delle misure del risultato clinico era il Free Testosterone nel siero. Il metodo utilizzato per misurare il Free Testosterone, un test RIA diretto che sostiene di misurare la concentrazione di Testosterone Libero (cosa che non fa) è quello il cui uso ho screditato in una lettera all'Editor pubblicata più di 3 anni fa. Non molto tempo dopo, Vermeulen et al. hanno pubblicato un confronto sperimentale affiancato di metodi per determinare la concentrazione di Free Testosterone nel siero.

Questi esperimenti dimostrano definitivamente che il dosaggio RIA diretto del Free Testosterone è seriamente inaccurato e sottostima numerose volte la sua concentrazione.

A mia conoscenza, non ci sono dati che contraddicano queste conclusioni. Quindi, sono sorpreso di scoprire che il metodo di analisi diretta non solo era ancora usato per scopi investigativi, ma veniva anche pubblicato nella rivista di Endocrinologia tra le più importanti nel mondo...

Free Testosterone, Inaccuratezza e Sottostima Test RIA

0021-972X/01/$02.00/0
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
Copyright © 2001 by The Endocrine Society
Vol. 86, No. 6

LETTER TO THE EDITOR

An Extraordinarily Inaccurate Assay for Free Testosterone Is Still with Us

To the editor:

Diagnostic Systems Laboratories, Inc
inappropriate measurements of free t
the journal during the period in qu

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
Copyright © 2001 by The Endocrine Society

William Rosner
Department of Endocrinology
St. Luke's-Roosevelt Hospital Center
New York, New York 10019

... Un Bollettino Tecnico del kit RIA diretto DSL (Beckman) pubblicizza: "Storicamente, i livelli di Free Testosterone sono stati determinati con un metodo noto come dialisi all'equilibrio... Il metodo è complesso, richiede molto tempo e notevoli attrezzature".

Al contrario, ci viene detto, il metodo RIA diretto DSL (Beckman) è semplice e rapido. L'unica difficoltà è che "il metodo di dialisi all'equilibrio ha dato valori circa 4 volte superiori a quelli ottenuti con il kit RIA";
tuttavia, come se ciò possa compensare l'imperdonabile inaccuratezza, il bollettino tecnico e il diagramma di accompagnamento del confronto RIA vs dialisi all'equilibrio puntualizzano che il coefficiente di correlazione è 0.92.

Anche questo è ingannevole: i punti all'estremità superiore del metodo RIA DSL (Beckman) sono i maggiori contributori alla linea di correlazione. L'esame visivo del diagramma indica che una linea attraverso i punti più bassi (17 di 21 punti al di sotto della linea di correlazione e 2 punti sopra di essa) avrebbe una pendenza sostanzialmente diversa rispetto a quello indicata dalla linea di correlazione pubblicata.

Pertanto, oltre ad essere inaccurata, l'osservazione indica che, rispetto al Riferimento, il test non è lineare. Tuttavia, il kit RIA rimane sul mercato perché è facile da usare...

Free Testosterone, Inaccuratezza e Sottostima Test RIA

0021-972X/01/$02.00/0
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
Copyright © 2001 by The Endocrine Society
Vol. 86, No. 6
Printed in U.S.A.

LETTER TO THE EDITOR

An Extraordinarily Inaccurate Assay for Free Testosterone Is Still with Us

To the editor:

Perusing the November 2000 issue of *JCE&M*, I noted an article in which one of the outcome measures was serum free testosterone (1). The method used to measure serum free testosterone, a direct RIA that purports to, but does not, measure the free testosterone concentration is one whose use I decried in a letter to the editor published more than 3

Diagnostic Systems Laboratories, Inc
inappropriate measurements of free t
the journal during the period in qu
(http://www.dslabs.com/techlit/49
ly, free testosterone levels were des
equilibrium dialysis. . . . The method
and equipment intensive." Conversely, we are told, the DSL direct method is simple and rapid. The only difficulty is that "the equilibrium dialysis method gave values approximately 4 times higher than did the DSL kit." As if to compensate for the inexcusable inaccuracy, the tech-

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
Copyright © 2001 by The Endocrine Society

William Rosner
Department of Endocrinology
St. Luke's-Roosevelt Hospital Center
New York, New York 10019

... Quasi la metà delle pubblicazioni che si occupano di Testosterone Libero, nel periodo considerato, ha utilizzato un test RIA inaccurato per la sua misura.

Anche se la procedura di dialisi all'equilibrio (che richiede molto più tempo) fosse l'unica alternativa, la letteratura scientifica non dovrebbe usare un metodo così grossolanamente inaccurato quando esistono migliori.

Sappiamo tutti che numerosi test per gli ormoni nel siero che sono metodo-specifici.

Tuttavia, non conosco nessun altro test che ha dimostrato di essere così clamorosamente errato.

Received November 29, 2000. Address correspondence to: William Rosner, M.D., Department of Endocrinology, St. Luke's-Roosevelt Hospital Center, 1000 Tenth Avenue, New York, New York 10019.

2. **Rosner W.** 1997 Errors in the measurement of plasma free testosterone. J Clin Endocrinol Metab. 82:2014–2015 (Letter).
3. **Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM.** 1999 A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. J Clin Endocrinol Metab. 84:3666–3672.

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Metodi Indiretti

Simposio ELAS-Italia LIGAND ASSAY 2011. Poster P39

LE MISURE DI TESTOSTERONE TOTALE E TESTOSTERONE LIBERO: PROBLEMI EVIDENZIATI DAI RISULTATI DELLA VEQ IMMUNOCHECK

(1) QualiMedLab & Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa
(2) Laboratorio Analisi, Ricerche cliniche Prof. Manfredo Fanfani, Firenze
(3) Laboratorio Analisi, Usl 2 Piana di Lucca, Lucca
(4) Laboratorio Analisi, Spedali Civili, Brescia

A. Pilo[1]
S. Giovannini[1]
A. Renieri[1]
M. Pierini[1]
R. Conte[1]
R. Ndreu[1]
G. Fuzzi[2]
F. Corsi[3]
C. Iacobello[4]
G. Zucchelli[1]

Testosterone Libero (TL). Il range delle misure fornite dai metodi diretti sui campioni di controllo è 2-70 pg/mL. Se si eccettuano i campioni molto bassi (2-4 pg/mL), la variabilità osservata entro-metodo è 17%, mentre quella totale è 23%. Pertanto, la precisione è relativamente scarsa e non si osservano grandi differenze tra le medie dei metodi più usati (RIA DSL, RIA Radim, RIA DPC, RIA BioSource, EIA Radim).

Dai dati riportati in Tabella relativi ai valori di tre pool da cui sono stati ricavati i campioni di controllo misurati nei cicli 2010/2011, emerge quanto le misure dirette del TL siano lontane dai valori attesi. Infatti, rispetto alle stime indirette le concentrazioni di TL misurate con i metodi diretti risultano molto sottostimate (7 - 9 volte).

Ugualmente i risultati dei metodi diretti sono anche in contrasto con quanto riportato ampiamente in letteratura sul rapporto TL/TT. Questo rapporto calcolato dalle stime indirette (1.5-2.5%) è in linea con i valori attesi mentre se si usano le misure dirette il rapporto (0.2-0.3%) è abnormemente basso.

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Metodi Indiretti

Simposio ELAS-Italia LIGAND ASSAY 2011. Poster P39

LE MISURE DI TESTOSTERONE TOTALE E TESTOSTERONE LIBERO: PROBLEMI EVIDENZIATI DAI RISULTATI DELLA VEQ IMMUNOCHECK

A. Pilo[1]
S. Giovannini[1]
A. Renieri[1]
M. Pierini[1]
R. Conte[1]

Testosterone Libero RIA ed EIA
Dai dati in Tabella relativi ai valori dei pool da cui sono stati ricavati i campioni di controllo misurati nei cicli 2010/2011, emerge che le misure dirette del Testosterone Libero sono lontane dai valori attesi.

Infatti, rispetto alle stime indirette *(Nota: Testosterone Libero Calcolato)* le concentrazioni di Testosterone Libero misurate con i metodi diretti *(Nota: RIA ed EIA)* sono molto sottostimate (7 - 9 volte)

Tabella 2.

Pool	Testosterone libero: Misura diretta del TL con metodi RIA e EIA Valore medio, pg/mL	Testosterone libero: Stima indiretta del TL calcolata da TT e SHBG Valore medio, pg/mL	TT (ng/mL)	SHBG (nmol/L)
G001	4,1	29	1,9	47
G002	13	119	4,8	47
G003	51	374	14,9	42

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Test UF

ABO PROJECT

Nutre e guida la ricerca mirata contro il cancro

REPORT FIN

29/02/2008

PROGETTO 0052

STUDIO SULLA RELAZIONE TRA
METABOLICI E LIVELLI DI TESTO
IMPLICAZIONI NELLO SVILUPPO
PROGNOSI DELLE NEOPLASIE N

RESPONSABILI PROGETTO:
Dr.ssa Matelda Zancan
Dr.ssa Aline S. C. Fabricio
Associazione ABO c/o Centro Regionale Indicato
Ospedale Civile di Venezia, Ospedale Civile di Ve
Veneziana

Tabella 6. Concentrazioni di testosterone libero in sieri di donne, sia in pre che post menopausa, misurate con 2 diversi kit RIA di metodo diretto (DPC e Adaltis) e con il metodo indiretto dell'ultrafiltrazione.

Testosterone libero (pg/ml)	kit RIA DPC	Kit RIA ADALTIS	Ultrafiltrazione
Media	1.138	0.753	8.584
SD	0.566	0.310	4.173

Tabella 7. Dosaggio del testosterone libero nel siero di donne sia in pre che post menopausa: correlazione tra metodo RIA e metodo dell'ultrafiltrazione

	kit RIA ADALTIS	Ultrafiltrazione
kit RIA DPC	R=0.462 P=0.0051	R=0.79 P=0.0001
kit RIA ADALTIS		R=0.60 P=0.0005

R: coefficiente di correlazione
P: probabilità

In accordo con i dati della letteratura [38], il metodo RIA sottostima le concentrazioni del testosterone libero rispetto al metodo dell'ultrafiltrazione. I livelli molto bassi di testosterone libero circolante nelle donne (10 volte inferiori agli uomini) rappresentano da qualche tempo una sfida in termini di sensibilità ed accuratezza per la maggioranza dei kit RIA. Queste

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Test UF

TECHNIQUES AND INSTRUMENTATION

FERTILITY AND STERILITY®
VOL. 76, NO. 3, SEPTEMBER 2001
Copyright ©2001 American Society for Reproductive Medicine
Published by Elsevier Science Inc.
Printed on acid-free paper in U.S.A.

Validity of radioimmunological methods for determining free testosterone in serum

Obiettivo: **Valutare le concentrazioni di Testosterone Libero nel siero (Free T) in vari gruppi di donne con uso di una tecnica di ultrafiltrazione (UFT) e di due test RIA (RIA DSL Beckman, RIA DPC Siemens)** e studiare l'influenza di Levonorgestrel (LNG) e Noretisterone (NET).

Risultati: I livelli medi di Free T determinati con UFT erano di 5-6 pg/mL nella gran parte dei gruppi, ad eccezione delle pazienti con iperandrogenismo (8,3 pg/mL), iperplasia surrenalica congenita(10,7 pg/mL) e in trattamento con contraccettivi orali (1,9 pg/mL).
I valori dosati con il metodo UFT erano da 2 a 4 volte superiori rispetto al test RIA Siemens e da 3 a 7 volte superiori rispetto al test RIA Beckman.
La proporzione di Free T determinata con UFT era 0,9-1,2% del T Totale ed era 0,55% nel corso del trattamento con contraccettivi orali. La presenza di 10 ng/mL di GNL o NET aumentava i livelli di Free T di solo il 13%.

Conclusioni: **I livelli di Free T determinati con RIA sono molto inferiori a quelli misurati con UFT. Il rapporto tra i valori di UFT e RIA può variare a seconda dello stato endocrino.**
Nelle donne con livelli normali o elevati di SHBG, i derivati di Nortestosterone aumentano solo leggermente i livelli di Free T.

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Test UF

TECHNIQUES AND INSTRUMENTATION

FERTILITY AND STERILITY®
VOL. 76, NO. 3, SEPTEMBER 2001
Copyright ©2001 American Society for Reproductive Medicine
Published by Elsevier Science Inc.
Printed on acid-free paper in U.S.A.

Validity of radioimmunological methods for determining free testosterone in serum

Risultati:

... I risultati delle determinazioni RIA di Free Testostyerone (Free T) erano significativamente più bassi (P, 0.05) rispetto a quelli ottenuti con UFT: nelle normali donne sane, il livello medio del Free T con UFT è stato di circa 6 pg/mL, mentre utilizzando i due RIA, i risultati erano 2,3 pg/mL e 0,9 pg/mL in media **(Tabella 1, Fig. 1).**

Ciò corrisponde, rispettivamente, ad un rapporto tra i metodi di 2,5 (UFT vs RIA Siemens) e di 7 (UFT vs RIA Beckman) (Tabella 2).

Le linee di regressione hanno mostrato una stretta correlazione tra i tre metodi.

Nelle donne trattate con contraccettivi orali (OC), la soppressione del T Totale a 0,34 ng/mL (rispetto a 0,54 ng/mL nelle donne non trattate) e il forte aumento dei risultati di SHBG causa una riduzione marcata di Free T a 1,9 pg/mL misurata con il metodo di ultrafiltrazione ed una riduzione a 0,65 pg/mL con entrambi i RIA (Tabella 1).

Ancora una volta, c'era una stretta correlazione tra i risultati dei tre metodi **e il rapporto tra i valori UFT e i risultati di entrambi RIA era circa 3 ...**

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Test UF

TECHNIQUES AND INSTRUMENTATION

FERTILITY AND STERILITY®
VOL. 76, NO. 3, SEPTEMBER 2001
Copyright ©2001 American Society for Reproductive Medicine
Published by Elsevier Science Inc.
Printed on acid-free paper in U.S.A.

Validity of radioimmunological methods for determining free testosterone in serum

Risultati: ... I valori con metodo UFT erano da 2 a 4 volte superiori rispetto al test RIA Siemens e da 3 a 7 volte superiori rispetto al test RIA Beckman ...

... Il rapporto tra i valori di UFT e RIA può variare a seconda dello stato endocrino ...

TABLE 1

Serum concentrations of free T as measured by the ultrafiltration technique or by the two RIAs, DPC and DSL, of total T and SHBG in various groups of women (mean ± SD).

Patients	Test di Riferimento Free T (UFT) (pg/mL)	RIA Siemens Free T (DPC (pg/mL)	RIA Beckman Free T (DSL (pg/mL)	Total T (ng/mL)	SHBG (nmol/L)
Normal healthy women	5.96 ± 2.65	2.27 ± 1.12	0.87 ± 0.49	0.54 ± 0.18	69 ± 32
Patients with acne	6.03 ± 5.39	1.85 ± 0.79	1.50 ± 0.55	0.50 ± 0.15	115 ± 102
Patients with hirsutism	6.10 ± 2.70	2.92 ± 1.22	1.75 ± 0.50	0.51 ± 0.13	90 ± 90
Hyperandrogenemia	8.30 ± 3.54	3.37 ± 1.80	1.98 ± 0.95	0.80 ± 0.29	73 ± 44
Patients with AGS	10.70 ± 8.58	2.71 ± 1.76	1.80 ± 1.29	0.92 ± 0.61	86 ± 73
Pregnant women	6.51 ± 2.89	2.02 ± 1.03	1.16 ± 0.83	0.72 ± 0.25	119 ± 97
Women using OC	1.90 ± 1.60	0.64 ± 0.89	0.65 ± 0.44	0.34 ± 0.24	313 ± 82
Menopausal women	5.10 ± 3.08	2.16 ± 1.39	1.51 ± 1.02	0.52 ± 0.34	76 ± 41

Gruschke. Validity of free testosterone determination. Fertil Steril 2001.

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Test UF

AND INSTRUMENTATION

FERTILITY AND STERILITY®
VOL. 76,
Copyright ©2001 Americ

Validity of radioimmunological m
for determining free testosterone

Annette Gruschke, M.D., and Herbert Kuhl, Ph.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, J. W. Goethe University, Frankfurt am Ma

Figura 1

I risultati delle determinazioni di Free T mediante RIA sono significativamente più bassi (P, 0.05) rispetto a quelli ottenuti con UFT.

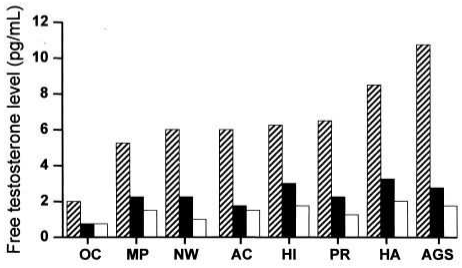
Colonne tratteggiate: metodo UFT

Colonne solide: RIA Siemens

Colonne aperte: RIA Beckman

FIGURE 1

Comparison of the serum concentrations of free T in various groups of women as determined by means of an ultrafiltration technique and two commercially available radioimmunoassays (RIA DPC and RIA DSL). Hatched columns represent ultrafiltration; solid columns represent RIA DPC; and open columns represent RIA DSL. OC = women using oral contraceptives, MP = menopausal women, NW = normal healthy women, AC = patients with acne and normal total T, HI = hirsute women with normal total T, PR = pregnant women, HA = patients with hyperandrogenemia, AGS = patients with adrenogenital syndrome.



Gruschke. Validity of free testosterone determination. Fertil Steril 2001.

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Test UF

TECHNIQUES AND INSTRUMENTATION

FERTILITY AND STERILITY®
VOL. 76, NO. 3, SEPTEMBER 2001
Copyright ©2001 American Society for Reproductive Medicine
Published by Elsevier Science Inc.
Printed on acid-free paper in U.S.A.

Validity of radioimmunological methods for determining free testosterone in serum

Tabella 2. I valori dosati con metodo UFT (test di Riferimento) sono 2-4 volte superiori rispetto al RIA Siemens e 3-7 volte superiori rispetto al test RIA Beckman

TABLE 2

Percentage of free fraction of T as determined by the ultrafiltration method or the RIAs (DPC and DSL) and ratios calculated from the free fractions measured by UFT, DPC, and DSL (means and SDs).

Patients	Free T (%) UFT	Free T (%) DPC	Rapporto UFT vs RIA Siemens	Ratio UFT/DPC	Free T (%) DSL	Rapporto UFT vs RIA Beckman	Ratio UFT/DSL
Normal healthy women	1.07 ± 0.20	0.42 ± 0.14		2.55	0.15 ± 0.05		7.13
Patients with acne	1.17 ± 0.76	0.39 ± 0.14		3	0.31 ± 0.09		3.77
Patients with hirsutism	1.19 ± 0.40	0.57 ± 0.20		2.09	0.35 ± 0.08		4.25
Hyperandrogenemia	1.02 ± 0.19	0.40 ± 0.16		2.55	0.24 ± 0.07		4.25
Patients with AGS	1.23 ± 0.73	0.30 ± 0.09		4.1	0.19 ± 0.04		6.47
Pregnant women	0.91 ± 0.25	0.28 ± 0.11		3.25	0.16 ± 0.08		5.69
Women using OC	0.55 ± 0.06	0.17 ± 0.08		3.24	0.19 ± 0.04		2.89
Menopausal women	1.04 ± 0.25	0.44 ± 0.14		2.36	0.30 ± 0.07		3.47

Gruschke. Validity of free testosterone determination. Fertil Steril 2001.

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Test UF

TECHNIQUES AND INSTRUMENTATION

FERTILITY AND STERILITY®
VOL. 76, NO. 3, SEPTEMBER 2001
Copyright ©2001 American Society for Reproductive Medicine
Published by Elsevier Science Inc.
Printed on acid-free paper in U.S.A.

Validity of radioimmunological methods for determining free testosterone in serum

DISCUSSIONE

... Le concentrazioni di Free T misurate con i due kit RIA erano molto basse e hanno raggiunto solo il 25-50% (RIA Siemens) o il 15-35% (RIA Beckman) di quelli determinati con UFT. In precedenti studi è stata osservata una discrepanza simile tra i risultati del kit RIA Siemens e quelli ottenuti con la Dialisi all'equilibrio vs metodo Ultrafiltrazione. La causa dei bassi valori ottenuti con i kit RIA diretti di Free T non è stata completamente chiarita.

... I risultati attuali mostrano che le concentrazioni nel siero di Free T, misurate con test RIA diretti, sono molto inferiori a quelli misurati con UFT. Nelle donne normali e nella maggior parte dei gruppi di pazienti, c'era una stretta correlazione tra i valori misurati con UFT e quelli determinati con RIA. Tuttavia, la correlazione è risultata scarsa nelle pazienti con acne e irsutismo che avevano normali livelli di T Totale. Pertanto, sembra essere opinabile il significato delle misure di routine delle concentrazioni nel siero di Free T come strumento diagnostico per pazienti con sintomi androgenici.

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Test EqD

Aging Male, 2013; 16(4): 164–168
© 2013 Informa UK Ltd. DOI: 10.3109/13685538.2013.835800

ORIGINAL ARTICLE

Free testosterone by direct and calculated measurement versus equilibrium dialysis in a clinical population

Introduzione: **Abbiamo valutato la concordanza tra Free Testosterone (FT) RIA e calcolato (cFT) rispetto al metodo FT di Dialisi all'equilibrio (EqD), considerato il Gold standard.**
Metodi: Abbiamo valutato il FT nei campioni di sangue di cinquantasei uomini (età 26-77), compresi uomini con deficit trattati e non trattati di testosterone (TD) e uomini senza TD. I campioni sono stati aliquotati e testati con le due metodologie presso un laboratorio di riferimento nazionale di Quest Diagnostics. Il cFT è stato calcolato con il metodo di Vermeulen.
Risultati: è stata osservata una correlazione robusta tra RIA e EqD (r=0.966) e tra cFT e EqD (r=0.986). Correlazioni elevate sono state osservate per gli uomini in terapia di testosterone e per gli uomini nei quartili più bassi e più alti di Testosterone totale e FT. La correlazione di Testosterone totale con FT era simile per cFT (r=0.843), RIA (r=0.806) ed EqD (r=0.809). L'SHBG non è risultata correlata ad alcuna misura di FT. L'analisi Bland-Altman ha dimostrato un bias simile per cFT e RIA, anche se cFT sovrastimava costantemente il FT.
I valori numerici del RIA erano circa sette volte più bassi del valore EqD.
Conclusioni: Questi risultati supportano l'uso clinico sia del RIA che del cFT come misure di FT.
A causa delle differenze numeriche, ogni test richiede un proprio set di valori di riferimento.

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Test EqD

Aging Male, 2013; 16(4): 164–168
© 2013 Informa UK Ltd. DOI: 10.3109/13685538.2013.835800

ORIGINAL ARTICLE

Free testosterone by direct and calculated measurement versus equilibrium dialysis in a clinical population

Ravi Kacker[1], Abby Hornstein[2], and Abraham Morgentaler[1]

[1]Men's Health Boston, Brookline, MA, USA and [2]Department of Pathology, University of Massachusetts Medical School, Pathology, Worcester, MA, USA

Abstract

Introduction: The v
Here, we evaluate
versus equilibrium
Methods: Fifty-six o
men with treated
were split and tes
laboratory. cFT wa
Results: A robust
($r = 0.986$). Strong
men in the lowest
with FT was similar
globulin (SHBG)
demonstrated sim
Numerical values f
Conclusions: These
numerical differen

Table 1. Characteristics of study population of 56 outpatients presenting to an outpatient andrology/infertility clinic.

	Mean	Range
Age (years)	53.8 ± 14.4	26–77
Total testosterone by EqD (ng/dL)	490.5 ± 253.1	87–1295
Free testosterone by EqD (pg/mL)	85.91 ± 57.11	20.84–294.26
SHBG (nmol/L)	34.6 ± 17.6	6–113
Calculated free testosterone (pg/mL)	105.4 ± 65.8	22–345
Free testosterone by RIA (pg/mL)	13.92 ± 8.59	4–44

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Test EqD

Aging Male, 2013; 16(4): 164–168
© 2013 Informa UK Ltd. DOI: 10.3109/13685538.2013.835800

ORIGINAL ARTICLE

Free testosterone by direct and calculated measurement versus equilibrium dialysis in a clinical population

Ravi Kacker[1], Abby Hornstein[2], and Abraham Morgentaler[1]

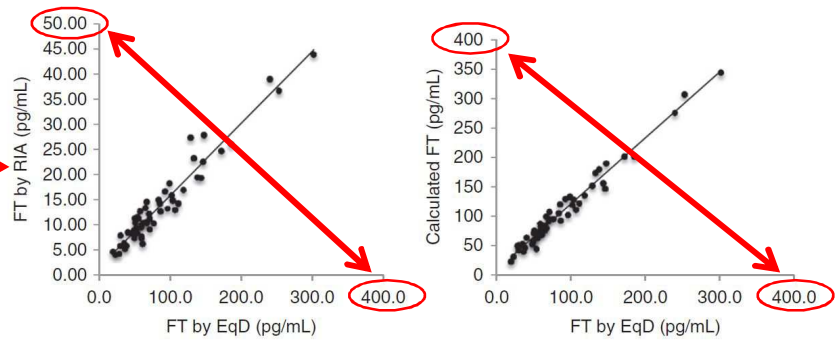


Figure 1. Correlations between calculated FT (left; $r = 0.986$) and FT by RIA (right; $r = 0.966$) against EqD.

Professoressa Linda Thienpont: **Presidente (2°mandato) della Commissione IFCC** per la Standardizzazione dei Test di Funzionalità Tiroidea

IFCC International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

Home | About us | News | IFCC eNews | eJIFCC | Index by Subject | Sitemap | Contact us

Leading the fields of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine worldwide

Executive Board and Council | **Scientific Division** | Education and Management | Communications and Publications | Congresses and Conferences | Resources & Downloads

You are here: Frontpage » Scientific Division » SD Committees » Standardization of Thyroid Function Tests (C-STFT)

Scientific Division

- SD Committees
- SD Working Groups
- SD Minutes
- Reference Materials
- Project Proposal Form
- SD Documents
- SD Yearly Publications of Interest
- Participation in External Programs and Joint Committees

Standardization of Thyroid Function Tests (C-STFT)

Membership

Name	Position	Country	Term	Time in Office
L. Thienpont	Chair	BE	2nd	2015 01 - 2017 12
B. Das	Member	IN	2nd	2015 01 - 2017 12
J.D. Faix	Member	US	2nd	2015 01 - 2017 12
F. MacKenzie	Member	UK	2nd	2015 01 - 2017 12
M. Rottmann	Member/Roche	DE	2nd	2015 01 - 2017-12
to be appoointed				
F. Quinn	Consultant	US		
K. Van Uytfanghe	Consultant	BE		

Terms of Reference

- Develop reference measurement systems (reference materials/reference methods) to est

Committee Chair's contact

Prof. Linda THIENPONT
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Ghent University
Ottergemsesteenweg 460
B-9000 GENT
BELGIUM
Tel: +32 9 264 8104
Fax: +32 9 264 8198
E-mail: Linda.Thienpont@ugent.be

Professoressa Linda Thienpont: **Premio IFCC 2011** per i migliori successi raggiunti nello sviluppo di Standard per l'utilizzo in Medicina di Laboratorio

IFCC International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine — NEWS RELEASE

IFCC Robert Schaffer Award 2011 for Outstanding Achievements in the Development of Standards for Use in Laboratory Medicine
Professor Linda THIENPONT

Milan, 12th April 2011 - IFCC, the leading organization in the field of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine worldwide, today announced that Professor Linda THIENPONT, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Belgium, is the winner of the 2011 IFCC-Robert Schaffer Award for Outstanding Achievements in the Development of Standards for Use in Laboratory Medicine.

The 20
for Use
has ma
materia
would i

Linda
Labora
referen
reviewe
invited
distingu
numbe

Da IFCC: Linda Thienpont, Professore di Chimica Analitica e Direttore del Laboratorio di Riferimento di Chimica Analitica presso l'Università di Ghent, Belgio, ha dimostrato eccezionale leadership nello sviluppo di procedure di misura di riferimento per le analisi di laboratorio. Ha pubblicato oltre 100 articoli sul tema dello sviluppo e standardizzazione dei metodi analitici e ha partecipato come relatore a molti importanti congressi medici e clinici di tutto il mondo. **Ha una lunga e brillante serie di registrazioni sullo sviluppo di metodi standardizzati e di materiali di riferimento per l'utilizzo nella misura di un gran numero di analiti, compresi steroidi e ormoni tiroidei, nonché numerosi altri analiti.**

Free Testosterone, Necessario Validare Procedura (RMP)

ELSEVIER Clinical Biochemistry 38 (2005) 253–261

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

K. Van Uytfanghe[a], D. Stöckl[a], J.M. Kaufman[b], T. Fiers[b], A. De Leenheer[c], L.M. Thienpont[a,*]

[a]Laboratory for Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Harelbekestraat 72, B-9000 Gent, Belgium
[b]Laboratory for Hormonology and Department of Endocrinology, Ghent University Hospital, De Pintelaan 185, 9000-Gent, Belgium
[c]Laboratory for Medical Biochemistry and Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Harelbekestraat 72,

…Da un database di recente pubblicazione, ci siamo resi conto della **urgente necessità di sviluppo di una Procedura di Misura di Riferimento (RMP), validata per il Free Testosterone, che soddisfi i criteri ISO. Sulla base di quest'ultimo criterio, è ovvio che anche i cosiddetti Gold Standard per il Free Testosterone: la Dialisi all'equilibrio (ED) e l'Ultrafiltrazione (UF), possono essere definiti RMP solo a condizione che misurino direttamente nel dializzato o nell'ultrafiltrato il Free Testosterone separato.** Quindi, a rigor di termini, non potranno mai essere definite RMP tutte le procedure indirette di ED e UF, le quali misurano una frazione di Free Testosterone per poi convertirla in concentrazione mediante moltiplicazione per la concentrazione di Testosterone Totale quantificata in modo indipendente. **In questa prospettiva, abbiamo deciso di sviluppare un candidato RMP (cRMP) per il Free Testosterone basato su UF e di combinarlo con Gas Cromatografia, Spettrometria di Massa e Diluizione isotopica (UF-ID-GC/MS), per la quantificazione diretta del Testosterone nell'ultrafiltrato. Infatti, la UF-ID-GC/MS è la tecnologia stato-dell'arte per l'analisi degli ormoni steroidei.**

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Procedura RMP

ELSEVIER Clinical Biochemistry 38 (2005) 253–261

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

K. Van Uytfanghe[a], D. Stöckl[a], J.M. Kaufman[b], T. Fiers[b], A. De Leenheer[c], L.M. Thienpont[a,*]

[a]Laboratory for Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Harelbekestraat 72, B-9000 Gent, Belgium

Background/Method: La validità analitica degli immunodosaggi con analogo per Free Testosterone (FTe) è soggetta a molte controversie. **Abbiamo verificato la validazione di 4 test diretti con analogo e 1 metodo di calcolo FTe nei confronti di una procedura di misura di riferimento con tracciabilità metrologica, (RMP), basata su ultrafiltrazione e spettrometria di massa con diluizione isotopica (UF–ID–GC/MS), per la misura diretta del Te nell'ultrafiltrato.** A tal fine, abbiamo effettuato le **misurazioni comparate di 40 campioni di sieri maschili.**

Results: **La regressione di Deming ha mostrato che 3 dei test immunologici avevano moderata o buona correlazione ($0.8474 \leq r \leq 0.9241$) con il RMP; tuttavia, la slope era notevolmente inferiore a 1. Il procedimento di calcolo FTe era in buon accordo con questo risultato. Per tutti i dosaggi i valori di Sy/x erano superiori ai valori combinati di imprecisione, indicando la loro suscettibilità ad effetto-matrice del campione.**

Conclusions: **Lo studio ha dimostrato differenze sostanziali nella qualità analitica dei dosaggi FTe; inoltre, i risultati suggeriscono che, dopo estensione della valutazione ad una più ampia varietà di campioni, potrebbe essere opportuna la ricalibrazione di alcuni test con analogo.**

Free Testosterone, Sottostima RIA vs Procedura RMP

ELSEVIER Clinical Biochemistry 38 (2005) 253–261

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

Fiers[b], A. De Leenheer[c], L.M. Thienpont[a,*]

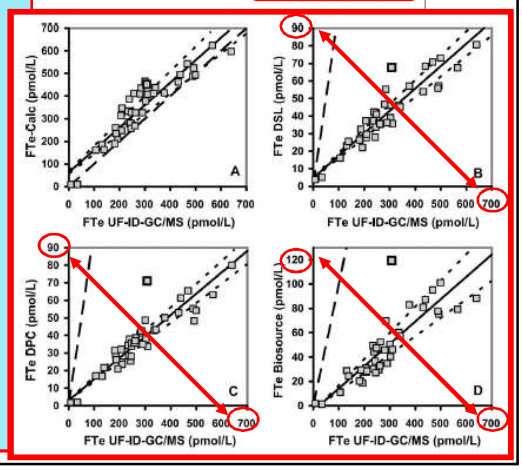
Fig. 1. Risultati della misura di FTe nel siero (pmol/L) ottenuti rispetto al test UF–ID–GC/MS di riferimento (cRMP)

A. Procedimento di calcolo FTe

B. RIA DSL Immunotech Beckman (valori oltre 7 volte inferiori al test di Riferimento UF–ID–GC/MS)

C. RIA DPC Coat-A-Count Siemens (valori oltre 7 volte inferiori al test di riferimento UF–ID–GC/MS)

D. RIA Biosource (valori oltre 5 volte inferiori al test di riferimento UF–ID–GC/MS)



Free Testosterone, Proposta di Validazione **MAGLUMI** vs Procedura RMP

Oggetto: **Re: Happy Easter !**
Data: **Wednesday, April 16, 2014 5:17 PM**
Mittente: **Angelo Maggio**
A: **Linda Thienpont**

Dear Linda,

me too I am very happy to hear from you !

Since some time I wanted to contact you, to bring to your attention a proposal for an analytical validation.

The diagnostics company I work for has acquired the distribution for Italy of the SNIBE company (www.snibe.com/en), a qualified Chinese manufacturer of the MAGLUMI automation systems in ImmunoChemiluminescence, and before issuing for sales all kits from the big MAGLUMI list (over 100 assays), we decided to perform before an analytical evaluation either internally or at some Italian reference centers.
To date, we validated over 60 kits, all usable on different SNIBE instrumental platforms (MAGLUMI 600, 800 MAGLUMI, MAGLUMI 1000, MAGLUMI 2000, MAGLUMI 2000 Plus, 4000 MAGLUMI, in addition to BIOLUMI 8000, an integrated system of Immunoassay and Clinical Chemistry).

Among these assays, we also evaluated the MAGLUMI kit for Free Testosterone, which is today the only availables direct test in automation. We have not yet completed a comparison vs FAI (the Free Androgen Index calculated with Total Testosterone and SHBG) or cFT (calculated Free Testosterone, using the Vermeulen or other equations for Free and/or Bioavailable Testosterone).
However, in the various comparisons that we conducted, vs both RIA assays (DiaSource, DSL, Immunotech, Radim, Siemens) and EIA (DiaMetra), the MAGLUMI Free Testosterone assay is fairly correlated (r obtained: from 0.60 to 0.97), with discrete clinical concordance (75% - 98%) using the respective reference intervals.

Segue Messaggio ...

Free Testosterone, Proposta di Validazione **MAGLUMI** vs Procedura RMP

Seguito Messaggio:

Anyway, we got an overestimation from about 1.5 to about 7 times vs. the comparison immunoassays, and this positive bias (by chance ?) it is similar as absolute value, but of opposite sign, to the negative bias which has been reported for the RIA and EIA assays, when compared to reference methods for Free Testosterone, as you have reported vs. ID–GC/MS, in the following article which I read with great interest:

Clin Biochem. 2005 to MAR; 38 (3) :253-61. 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. Van Uytfanghe K, Stöckl D, Kaufman JM, Fiers T, De Leenheer A, Thienpont LM.

So, I would like to know if you think that a similar validation would be possible for the MAGLUMI Free Testosterone assay. In this case, given the need for instrumentation MAGLUMI, blinded samples could be tested in our Lab.

Whether the proposal is of your interest, I'm grateful if you can give me some guidance about the requirements for this type of study.

Still lots of good wishes!
Angelo

Segue Risposta a Messaggio ...

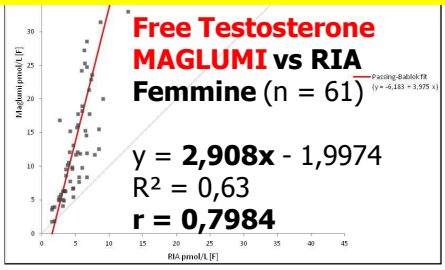
Free Testosterone, Procedura RMP Non Più Disponibile

Oggetto: **Re: Happy Easter !**
Data: **Fri, 18 Apr 2014 09:08:41 +0200**
Mittente: **Linda Thienpont**
A: **Angelo Maggio, Katleen Van Uytfanghe**

Dear Angelo,
I consulted with my postdoc, who developed the candidate reference method for Free Testosterone, and supervises my reference lab. Unfortunately, she answered we have currently no time and resources to pick up the method.
We are a small reference laboratory and so frequently asked, that we had to prioritize the analytes for which we offer reference measurement services. These analytes are: steroid hormones (total), thyroid hormone (total and free), 25OHD2 and 25OHD3 with 3-epi of 25OHD3, metabolites/substrates.
For all these assays we are ISO 17025/15195 accredited and the methods are JCTLM listed, so is our reference lab (see at the JCTLM website at http://www.bipm.org/jctlm/).
Our Free Testosterone method was seldom asked by the IVD industry for application, so we decided to not keep it running on a daily basis, nor did we include it in our accreditation scope.
I regret to have to disappoint you, but maybe, you will be interested in working with us, later on, for one of the other analytes.
With best regards, met vriendelijke groet,
Linda

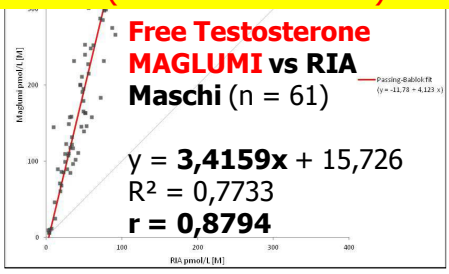
Prof. Dr. Linda THIENPONT
Laboratory for Analytical Chemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
University of Ghent
Harelbekestraat 72
B-9000 GENT, Belgium
Tel. +32 9 264 81 04

Free Testosterone **MAGLUMI**
Correlazioni vs Calcolato e RIA (*Da: Dati in file MS*)



Free Testosterone MAGLUMI vs RIA Femmine (n = 61)

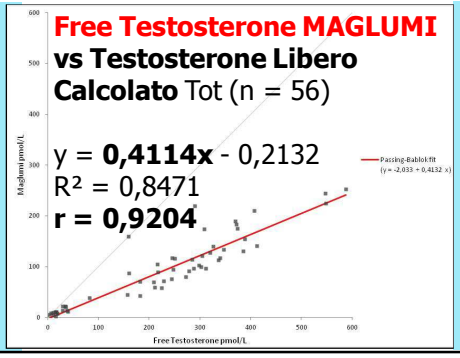
y = **2,908x** - 1,9974
R^2 = 0,63
r = 0,7984



Free Testosterone MAGLUMI vs RIA Maschi (n = 61)

y = **3,4159x** + 15,726
R^2 = 0,7733
r = 0,8794

Il test Free Testosterone MAGLUMI sovrastima vs il test RIA perché correla meglio con la misura del Testosterone Libero Calcolato



Free Testosterone MAGLUMI vs Testosterone Libero Calcolato Tot (n = 56)

y = **0,4114x** - 0,2132
R^2 = 0,8471
r = 0,9204

Testosterone Libero Calcolato con Calcolatore ISSAM secondo metodo di Vermeulen et al (*J Clin Endocrinol Metab. 1999*), in base a concentrazione di Albumina prefissata di 43 g/L (pm 69.000 Da) e costante di affinità del Testosterone per SHBG (KT) di 1x109 l/mol.

Nota: Il **Testosterone Libero Calcolato**, benché dipendente da accuratezza e sensibilità dei test usati per Testosterone Totale e di SHBG, è la stima più utile di Testosterone Libero e mostra una eccellente correlazione con il metodo di riferimento di Dialisi all'Equilibrio o Ultrafiltrazione, corrispondente al più alto livello metrologico (*Position statement Endocrine Society, JCEM 2007*).