

## Problematiche di determinazione del testosterone libero.

Simona Ferraro, Davide Ubezio, Giorgio Bellomo

Laboratorio di Ricerche Chimico Cliniche, Università degli Studi del Piemonte Orientale, A O Maggiore della Carità, Novara

**RIASSUNTO** Il dosaggio sierico di testosterone libero risulta utile nella diagnosi di ipogonadismo e disfunzione erettile, associati a patologie in cui solo la quota libera varia significativamente rispetto alla concentrazione totale. Nel dosaggio immunometrico di testosterone la forte variabilità inter/intra-saggio, è dovuta a scarsa specificità dell'anticorpo, interferenze da SHBG e da altre componenti strutturalmente correlate al testosterone, inadeguata sensibilità analitica, impropria standardizzazione del metodo e inadeguata ottimizzazione degli intervalli di normalità. Il presente studio basato sulla determinazione sierica di testosterone totale, libero ed SHBG su controlli sani differenziati per sesso, si propone: (a) il confronto e correlazione tra due determinazioni radioimmunometriche di testosterone libero (BIOCODE e Adaltis); (b) la valutazione dell'indice di androgeni liberi FAI (Free Androgen Index) nelle due popolazioni di controllo; (c) la correlazione dei valori di testosterone libero con l'indice FAI. Come primo risultato si è dimostrato che i livelli di SHBG non interferiscono nel dosaggio di testosterone libero BIOCODE (correlazione inversa  $r=-0,39; p<0,006$ ); quindi si è determinata una buona correlazione tra i due metodi BIOCODE e Adaltis sia nella popolazione sana maschile ( $r=0,756; p<0,0001$ ) che femminile ( $r=0,855; p<0,0001$ ), sebbene il metodo BIOCODE sovrastimi nella prima mentre il metodo Adaltis nella seconda popolazione. L'indice FAI è risultato molto variabile e inattendibile rispetto alle determinazioni RIA di testosterone libero. La variabilità analitica si dimostra elevata per valori bassi di testosterone libero (BIOCODE).

**Parole chiave:** Testosterone libero, FAI (Indice di androgeni liberi), Dosaggio immunometrico, Ipogonadismo.

**SUMMARY** *Warnings in serum free testosterone immunodetection.* The measurement of free testosterone in serum is a helpful tool for the clinical evaluation of adrenal and gonadal status. In man this detection is used to investigate testicular hypogonadism and erectile dysfunction in disorders associated to the exclusive free fraction decrease. The free testosterone immunoassays often correlate very poorly: most commercially available kits demonstrate between-kit variability, greatest at low analyte concentrations. These discrepancies may reflect specimen-based interferences (SHBG), inadequate method standardization, low assay specificity, inappropriate wide reference range. The aims of the present study, performed on 91 healthy volunteers (46 male and 45 female), were: 1) a comparison and a correlation by linear regression between two free testosterone commercially available radioimmunoassays (BIOCODE and Adaltis); 2) the calculation of free androgen index (FAI) in two control groups; 3) a correlation of free testosterone levels with FAI in two groups. At first it was found that free testosterone levels were not positively affected by SHBG concentrations suggested by the lack of any positive correlation between these two parameters found in the present study (Adaltis:  $r=-0,2; p<0,18$ ; BIOCODE:  $r=-0,39; p<0,006$ ); then a good correlation was found between BIOCODE and Adaltis assays both in healthy male population ( $r=0,756; p<0,0001$ ) and in healthy female population ( $r=0,855; p<0,0001$ ). With the BIOCODE assay the free testosterone levels were higher than with the Adaltis assay in the male population (BIOCODE =  $24,15 \pm 10,53$  pg/mL; Adaltis =  $13,4 \pm 4,2$  pg/mL); on the contrary the Adaltis assay seemed to overestimate the free testosterone levels in the female group (BIOCODE =  $0,997 \pm 1,15$  pg/ml; Adaltis =  $1,44 \pm 0,7$  pg/ml). The intra-assay coefficient of variation of the in-house method BIOCODE, ranged between 8.2 and 20% (average, 14.1%), and it was greater for lower levels. The FAI index showed an extremely high variability when compared to free testosterone immunodetection, thus suggesting its unreliability for clinical and laboratory purposes. Despite the reference ranges suggested by BIOCODE and Adaltis for free testosterone levels were comparable (BIOCODE = 11.5-42.5 pg/mL; Adaltis = 11.0-47.4 pg/mL) the measure performed in this study showed great discrepancies. This finding obviously needs a further and more detailed investigation. These data strongly suggest that there should be a continuous monitoring of different new assays for free testosterone detection and related reference ranges.

**Key words:** Free testosterone, FAI (Free Androgen Index), Immunoassay, Hypogonadism.

### INTRODUZIONE

La determinazione sierica di testosterone libero rappresenta uno strumento utile nella diagnosi di patologie surrenaliche e gonadiche<sup>1</sup>; per una valutazione attendibile, contemporaneamente, di livelli ormonali bassi in donne e bambini, ed elevati nel maschio, questa deve essere caratteriz-

zata da sensibilità elevata, buona precisione e intervallo analitico ampio<sup>2</sup>.

Come tutti i dosaggi immunometrici per ormoni steroidei<sup>3-5</sup>, anche la determinazione di testosterone libero dimostra scarsa concordanza tra metodi<sup>6-9</sup> (forte variabilità inter-saggio: CV=57-115%) soprattutto per basse concentrazioni ormonali; anche la variabilità intra-saggio risulta spesso molto elevata<sup>10</sup>. Queste limitazioni sono dovute principal-

mente a scarsa specificità dell'anticorpo, interferenze da SHBG<sup>11,12</sup> e da altre componenti strutturalmente correlate al testosterone<sup>13</sup>, inadeguata sensibilità analitica, impropria standardizzazione del metodo e inadeguata ottimizzazione degli intervalli di concentrazione relativamente alla metodica<sup>10</sup>.

Dal momento che il testosterone libero determinato immunometricamente, rappresenta solo una percentuale variabile (dal 20 al 60%) della quota biodisponibile, ("bioavailable"), sono stati introdotti indici, che calcolano l'effettiva frazione libera<sup>14-16</sup>; questi, mediante equazioni complesse, tengono conto di affinità e costanti di associazione di proteine di legame del testosterone: indice di testosterone libero FTI (*Free Testosterone Index*) secondo il metodo di Vermeulen<sup>16</sup>, e indice androgenico libero FAI (*free androgen index*), ottenuto dal rapporto 100xTestosterone Totale/SHBG<sup>17,18</sup>. I dati sperimentali dimostrano che l'indice più attendibile è rappresentato da FTI<sup>19</sup>, mentre l'indice FAI, varia fortemente in relazione alle variazioni di SHBG(20).

Il presente studio basato sulla valutazione serica di testosterone libero su popolazioni sane composte da 46 maschi e 45 femmine, con caratteristiche rapportabili alla popolazione afferente al laboratorio per sottoporsi a questo test, si propone: (a) un confronto e una correlazione tra le determinazioni di testosterone libero, effettuati secondo il metodo radioimmunometrico con due differenti metodiche; (b) il calcolo dell'indice FAI nelle popolazioni di controllo maschile e femminile; (c) la correlazione di FAI, nelle due popolazioni, con i valori di testosterone libero determinati con i due metodi.

## MATERIALI E METODI.

### Metodi

Il dosaggio di testosterone totale ed SHBG, sono stati effettuati in chemiluminescenza su analizzatore IMMULITE 2000-DPC (rif. produttore) su matrice sierica. Il testosterone libero viene determinato in parallelo con i due dosaggi radioimmunometrici competitivi BIOCODE (rif. produttore) e Adaltis (rif. produttore) su matrice serica.

### Gruppo di controllo

Nel presente studio sono stati reclutati 91 soggetti sani: 45 femmine (37,0±6,5 anni) e 46 maschi (39,6±9,0 anni) i cui sieri sono stati utilizzati per le determinazioni.

## RISULTATI

L'analisi statistica dei valori ottenuti dal dosaggio di testosterone libero con le metodiche immunoradiometriche BIOCODE ed Adaltis ha permesso di determinare i valori descritti in Tabella 1 nelle popolazioni sane femminile e maschile.

Si può osservare che i valori di testosterone libero nella popolazione femminile sono significativamente più elevati per il dosaggio Adaltis rispetto al dosaggio BIOCODE, contrariamente a quanto si verifica nella popolazione maschile, dove le determinazioni con metodica BIOCODE risultano significativamente più elevate rispetto alla metodica Adaltis. Secondo dati di letteratura valori significativamente più elevati di testosterone libero nella popolazione maschile potrebbero essere associati ad elevate concentra-

zioni di SHBG, interferenti nel dosaggio<sup>12</sup>; è stata quindi valutata, nella popolazione maschile, un'eventuale correlazione tra SHBG e testosterone libero, determinato sia con metodo BIOCODE che Adaltis, ritrovando i coefficienti di correlazione:  $r = -0,39$ ,  $p = 0,006$  nel primo caso ed  $r = -0,2$ ,  $p = 0,18$  (non significativo) nel secondo caso; la correlazione significativa negativa con la determinazione BIOCODE conferma che il testosterone libero aumenta con la riduzione della proteina legante e che questa non interferisce nel dosaggio. Sono stati quindi osservati nel siero degli stessi pazienti maschi, valori di testosterone libero fortemente discrepanti e valori sovrapponibili, determinati in parallelo con le due metodiche e sono state individuate le relative concentrazioni di SHBG nei due gruppi. Questa osservazione dimostra che, valori elevati di testosterone libero (13 casi), rilevati con il dosaggio BIOCODE (37,4 ± 7,2 pg/mL), fortemente discrepanti da quelli rilevati con il dosaggio Adaltis (16,4 4pg/mL) non sono associabili a elevati livelli di SHBG (23,9 ± 5,7 nmol/L); per livelli significativamente più elevati di SHBG (33,2 ± 9,2 nmol/L; 7 casi) i valori di testosterone libero per i due test risultano quasi sovrapponibili (BIOCODE = 13,1 ± 4,9 pg/mL; Adaltis = 11,8 ± 5,0 pg/mL). Il dato conferma ulteriormente che il dosaggio BIOCODE attualmente in uso non risente delle interferenze da SHBG.

I valori di testosterone libero determinato con in due metodi radioimmunometrici BIOCODE e Adaltis, sono stati elaborati mediante regressione lineare, dalla quale è emersa una buona correlazione sia nella popolazione femminile ( $p < 0,0001$ ;  $r = 0,855$ ) (Fig.1) che maschile ( $p < 0,0001$ ;  $r = 0,756$ ) (Fig.2); nella popolazione femminile (retta di correlazione con intercetta = 0,9 e pendenza = 0,52) si è dimostrata una sovrastima della metodica Adaltis rispetto alla determi-

Tabella 1

Concentrazione di testosterone libero nella popolazione di controllo femminile e maschile determinate con i metodi RIA BIOCODE e Adaltis.

Metodo	Concentrazione di testosterone libero, pg/mL (m ± ds)	
	Popolazione maschile	Popolazione femminile
BIOCODE	1,00 ± 1,15	24,15 ± 10,53
Adaltis	1,44 ± 0,70	13,40 ± 4,20

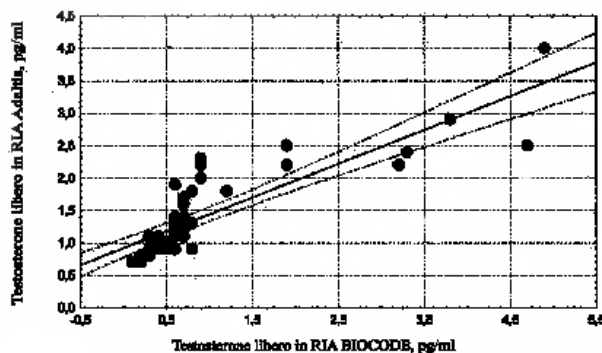


Figura 1

Correlazione tra valori di testosterone libero, valutati nella popolazione femminile con i metodi BIOCODE e ADALTIS

nazione BIOCODE; al contrario nella popolazione maschile la metodica BIOCODE sovrastima di molto rispetto alla determinazione Adaltis.

Successivamente sull'intera popolazione è stato calcolato l'indice FAI. Questo risulta nella popolazione femminile compreso tra 0,5 e 19,1% e nella popolazione maschile tra 25,9 e 102,3%. Questo indice correla, secondo dati di letteratura<sup>18</sup>, con la concentrazione di testosterone libero, quindi, per entrambe le metodiche, sia nella popolazione maschile che femminile sono state verificate le correlazioni. Dal momento che l'80% delle donne sane, secondo questa determinazione, presenta testosterone totale <50ng/dL, pari alla sensibilità analitica del metodo, per effettuare tale calcolo è stato assunto un valore mediano assoluto di 30ng/dL. Nella popolazione femminile la correlazione tra FAI e determinazione BIOCODE ha dimostrato  $r=0,897$  con  $p<0,0001$  (Fig.3) mentre Adaltis  $r=0,879$  con  $p<0,0001$  (Fig.4); nella popolazione maschile BIOCODE ha dimostrato  $r=0,614$  con  $p<0,0001$  (Fig.5) mentre Adaltis  $r=0,583$  con  $p<0,0001$  (Fig.6).

Una sola discreta e non soddisfacente correlazione nella popolazione maschile tra FAI e testosterone libero e una forte variabilità relativa soprattutto ai livelli di testosterone da cui discende il calcolo, sconsiglia l'utilizzo di questo indice in sostituzione del dosaggio della frazione libera dell'ormone.

I valori di testosterone totale nella popolazione sana maschile risultano compresi tra 244 e 773 ng/dL e nella popolazione sana femminile tra <50 e 121 ng/dL.

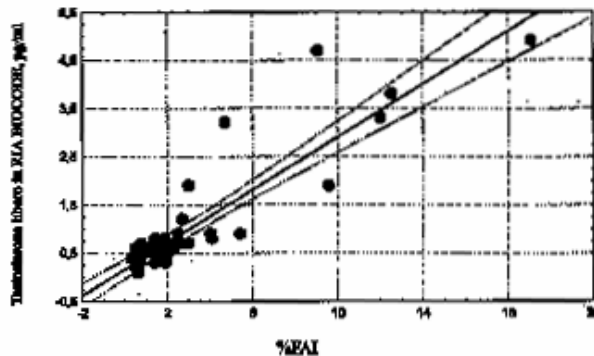
La determinazione di testosterone totale nella popolazione sana femminile ha rilevato 80% dei valori <50 ng/dL (limite di sensibilità analitica). Tale sensibilità non permette valutazioni accurate di livelli androgenici bassi come quelli riscontrabili nella popolazione femminile e nei bambini.

Le correlazioni ed i calcoli successivi sono stati effettuati tenendo conto della sola popolazione maschile. La valutazione della correlazione testosterone totale-SHBG nella popolazione maschile è risultata positiva ( $r=0,44$ ;  $p=0,0025$ ), come riportato in letteratura<sup>12</sup>. l'aumento della concentrazione della proteina legante induce l'aumento del testosterone totale dovuto ad aumento della quota legata.

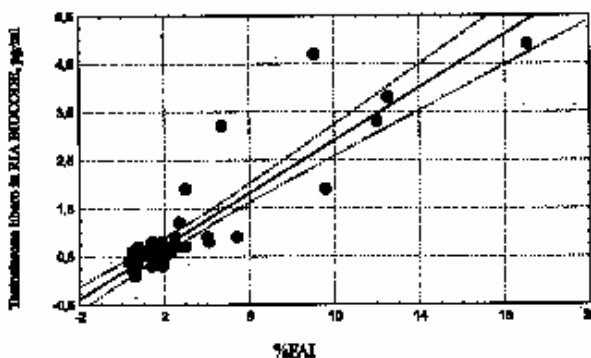
Sempre nella sola popolazione maschile, sono state valutate correlazioni positive tra testosterone totale e testosterone libero (per la determinazione del testosterone libero

con il kit BIOCODE  $r=0,36$ ,  $p=0,0143$ ; mentre per il kit Adaltis  $r=0,5$ ,  $p=0,0002$ ); in letteratura tuttavia si sconsiglia di utilizzare il valore del totale come predittore dei livelli di frazione libera<sup>20-23</sup>.

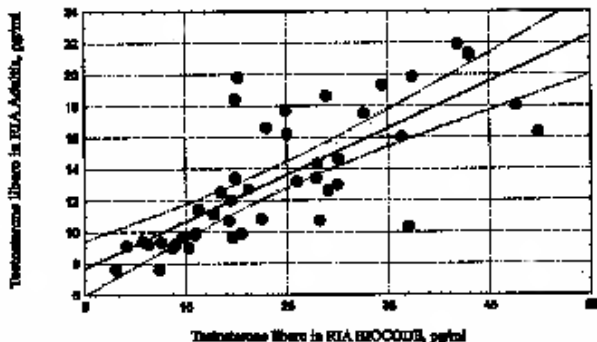
Nella popolazione maschile sono state determinate le percentuali di frazione libera di testosterone rispetto al totale ritrovando per i due kit di testosterone libero i seguenti



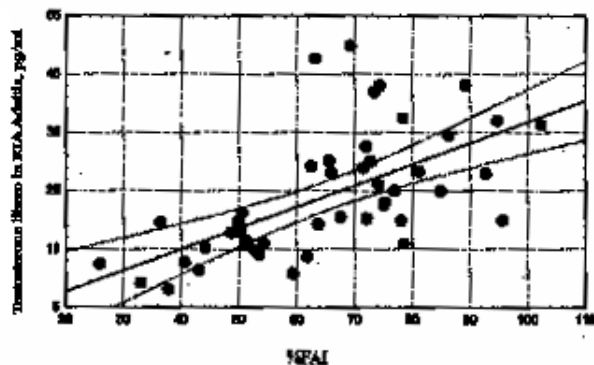
**Figura 3**  
Correlazione tra valori di testosterone libero, valutati nella popolazione femminile con il metodo BIOCODE e l'indice di androgeni liberi (FAI) calcolato



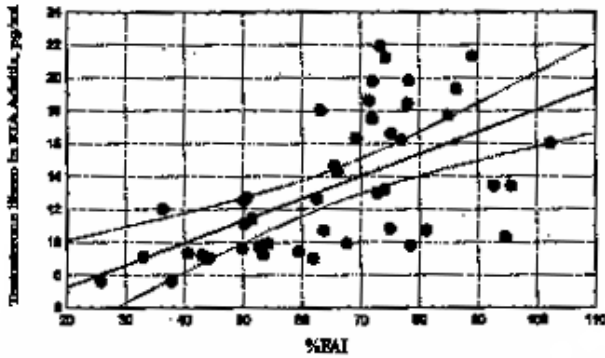
**Figura 4**  
Correlazione tra valori di testosterone libero, valutati nella popolazione femminile con il metodo ADALTIS e l'indice di androgeni liberi (FAI) calcolato



**Figura 2**  
Correlazione tra valori di testosterone libero, valutati nella popolazione maschile con i metodi BIOCODE e ADALTIS



**Figura 5**  
Correlazione tra valori di testosterone libero, valutati nella popolazione maschile con il metodo BIOCODE e l'indice di androgeni liberi (FAI) calcolato



**Figura 6**  
Correlazione tra valori di testosterone libero, valutati nella popolazione maschile con il metodo ADALTIS e l'indice di androgeni liberi (FAI) calcolato

valori: 0,18-1,06% con il kit BIOCODE e 0,16-0,49% con il kit Adaltis.

Inoltre è stata effettuata la correlazione tra le percentuali testosterone libero/totale con SHBG ritrovando le seguenti correlazioni negative: per la determinazione del testosterone libero con il kit BIOCODE  $r=-0,69$  e  $p<0,0001$  e con Adaltis  $r=-0,622$  e  $p<0,0001$

Nelle Tabelle 2 e 3 sono riportati i coefficienti di variabilità analitica (CVA) di testosterone totale e libero.

Come riportato in letteratura<sup>10</sup> una variabilità analitica consistente si riscontra per la determinazione di livelli androgenici molto bassi. Per testosterone libero e totale il Cva medio risulta quasi sovrapponibile (14%).

Per il testosterone totale sono noti CV biologico (CVb) intrasoggetto=8,8% e CV biologico intersoggetto=10%.

Sono state calcolate la variabilità totale:  $CV_{tot}=(CV_a^2+CV_b^2)^{1/2}=17,7\%$  e la differenza critica= $2,77x$  ( $CV_a^2+CV_b^2$ )<sup>1/2</sup>=47,09%.

La differenza critica valutata per il testosterone totale

**Tabella 2**  
Calcolo dei CVA differenziati per i 3 livelli di concentrazione dei controlli e Cva medio

Livello	n ripetizioni	Concentrazione media±ds	Intervallo ng/dL	CVa%
1	14	72,2±17,1	60-112	23,7
2	18	303,7±31,6	240-388	10,4
3	19	708,0±67,8	567-827	9,6
Medio				14,6

**Tabella 3**  
Calcolo dei CVA differenziati per i 2 livelli di concentrazione dei controlli e Cva medio

Livello	n ripetizioni	Concentrazion media±ds	intervallo pg/mL	CVa%
1	13	1,8±0,4	0,6-2,4	20,0
2	13	18,8±1,5	16,3-27,5	8,2
Medio				14,1

rappresenta un dato aggiuntivo importante all'intervallo di riferimento calcolato.

## DISCUSSIONE

Il testosterone libero, si è dimostrato un parametro diagnostico importante nell'ipogonadismo e nella disfunzione erettile, associati a patologie in cui notoriamente, solo la quota libera varia significativamente, rispetto alla concentrazione totale<sup>20-23</sup>. Il testosterone libero determinato immunometricamente rappresenta solo una frazione variabile (20-60%)<sup>9,19</sup> della quota libera attiva dell'ormone; sono stati quindi introdotti indici, come FTI e FAI per il calcolo dell'intera quota libera<sup>2</sup>.

In letteratura è ampiamente riportato che le determinazioni di testosterone libero presentano elevata variabilità intra ed interdeterminazione<sup>10</sup>. Queste derivano da una sola parziale standardizzazione dei metodi comunemente in uso. In relazione alla necessità di uniformare le determinazioni di testosterone<sup>10</sup>, questo studio si è proposto la valutazione ed il confronto tra le determinazioni RIA di testosterone libero su matrice sierica con due metodi di uso routinario attuale (BIOCODE) e di uso precedente (Adaltis)

A tale scopo è stato reclutato un numero significativo di controlli sani, di sesso femminile e maschile, di età sovrapponibile con la popolazione afferente al laboratorio per sottoporsi a questo test. I sieri sono stati utilizzati per i dosaggi di testosterone totale, libero ed SHBG.

Il primo risultato importante nella valutazione metodologica del dosaggio radioimmunologico di testosterone libero, con le due differenti determinazioni, deriva dall'analisi di eventuali interferenze dovute ad SHBG. Solo per la metodica BIOCODE, attualmente in uso, si è rivelata una significativa correlazione inversa tra frazione ormonale libera e proteina di legame, che dimostra come, livelli elevati di SHBG, non interferiscano nel dosaggio. Dal confronto tra le due determinazioni di testosterone libero BIOCODE e Adaltis, emerge una correlazione molto significativa ( $p<0,0001$ ) sia nella popolazione femminile ( $r=0,855$ ) che in quella maschile ( $r=0,756$ ). E' tuttavia emersa nella popolazione femminile una sovrastima della metodica Adaltis rispetto alla determinazione BIOCODE, mentre nella popolazione maschile la metodica BIOCODE sovrastima di molto rispetto alla determinazione Adaltis.

Successivamente le determinazioni di testosterone libero sono state correlate all'indice FAI calcolato sia nella popolazione maschile che femminile. Da quanto riportato si è dimostrata una correlazione migliore nella popolazione femminile rispetto alla popolazione maschile ( $p<0,0001$ ;  $r=0,6$ ). In relazione a questo dato e al fatto che l'indice derivi dal rapporto  $100 \times$  testosterone totale/SHBG, dove il testosterone totale ha una variabilità intraindividuale importante, si sconsiglia il calcolo dell'indice FAI in sostituzione della determinazione radioimmunologica della frazione libera ormonale. Questo dato risulta importante dal momento che aumenta la tendenza clinica di utilizzare l'indice FAI in associazione e a volte in sostituzione al dato del dosaggio di testosterone libero conferendogli la stessa importanza<sup>17</sup>. Inoltre, effettuando il dosaggio del testosterone totale sui controlli sani di sesso femminile con la metodica DPC, è stato valutato che l'80% della popolazione sana presenta livelli  $<50$  ng/dL, sensibilità analitica del metodo. Questo

dosaggio risulta dunque caratterizzato da una sensibilità analitica scarsa, inadatta a determinazioni di livelli ormonali bassi come quelli rilevati nelle donne e nei bambini.

Successivamente si è valutata una sola discreta correlazione positiva tra i livelli di frazione libera e testosterone totale; come confermato da numerosi studi i valori di testosterone totale non sono predittivi dei livelli di frazione libera, sia nella popolazione sana che in caso di patologie come diabete, dove variazioni importanti della frazione libera non sono associate a variazione della quota totale<sup>20-23</sup>.

Nella valutazione della precisione delle diverse determinazioni sono stati calcolati i coefficienti di variabilità analitica (CVa) relativi ai dosaggi testosterone libero BIOCODE e testosterone totale (DPC). Nel caso della determinazione di testosterone totale e libero l'imprecisione massima (CVa intorno al 20%) è stata calcolata per livelli ormonali bassi (60-112 ng/dl per testosterone totale e 0,6-2,4 pg/mL per la frazione libera); il CVa medio calcolato per entrambe le determinazioni di testosterone totale (DPC) e frazione libera (BIOCODE) risulta intorno al 14%. Disponendo per il testosterone totale, della variabilità biologica intrasoggetto (8%) ed intersoggetto (10%) è stato possibile determinare la variabilità totale, ovvero il grado di incertezza globale che accompagna ogni singolo risultato; questo si colloca intorno al 18%. Un'informazione aggiuntiva, agli intervalli di riferimento, è data dal calcolo della differenza critica che per il testosterone totale si colloca intorno al 47%.

In questo studio si è dimostrato che le due metodiche per la determinazione del testosterone libero, pur rilevando valori fortemente discrepanti sugli stessi campioni, presentano intervalli di riferimento quasi sovrapponibili. Il numero di campioni rientrati nello studio non risulta tuttavia significativo per la definizione attendibile di intervalli di riferimento intralaboratoristici, stratificati per fascia di età (nel caso della popolazione maschile) e per fasi del ciclo mestruale (nella popolazione femminile). Vengono tuttavia riportate alcune considerazioni, relative all'inadeguatezza degli intervalli di riferimento per le determinazioni di testosterone libero e totale, effettuate in base all'osservazione dei valori delle determinazioni nelle due popolazioni di controlli sani e al calcolo, dei coefficienti di asimmetria e curtosi, dopo normalizzazione. In definitiva i valori estremi assoluti osservati nella popolazione maschile risultano confrontabili a quelli consigliati solo nel caso della metodica BIOCODE, mentre nel dosaggio Adaltis i valori delle determinazioni risultano significativamente più bassi rispetto degli intervalli consigliati. Questi ultimi sembrano decisamente inadeguati alla popolazione sana in esame, a conferma del sospetto derivato dall'uso routinario del metodo.

La stessa osservazione effettuata sui livelli di testosterone totale nella popolazione sana maschile, dimostra livelli significativamente più bassi rispetto ai valori di riferimento consigliati dalla DPC.

In definitiva mediante le valutazioni esposte nel corso dello studio, è stato dimostrato che il dosaggio di testosterone libero, con metodo BIOCODE attualmente in uso, risulta attendibile e non risente delle interferenze della proteina di legame SHBG, mentre la complessa valutazione di range di riferimento di normalità inadeguati necessita di una ulteriore indagine, secondo i criteri proposti

dall'NCCLS<sup>24</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Derksen J, Nagesser SK, Meinders AE, et al.** Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women. *N Engl J Med* 1994; 331:968-73
2. **Levesque A, Letellier M, Swirski C, et al.** Analytical evaluation of the testosterone assay on the Bayer Immuno 1™ System. *Clin Biochem*, 1998; 31:23-28
3. **Büttner J.** Philosophy of measurement by means of immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1998; 35:354-363.
4. **Middle J.** Standardization of steroid hormone assay. *Ann Clin Biochem*, 1998; 35:54-63
5. **Thinpont LM.** Standardization of steroid immunoassay-in theory an easy task. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:349-52
6. **Schroder V, Thode J.** Six direct RIAs of estradiol evaluated. *Clin Chem* 1988; 34:949-52
7. **Whitley RJ, Meikle AW, Watts NB.** Gonadal steroids. *Burtis CA, Ashwood ER eds. Tietz Textbook of clinical chemistry*, 2nd ed, 1994; 1843-54
8. **Middle J.** Standardization of steroid hormone assay. *Ann Clin Biochem* 1998; 35:354-63
9. **Rosner W.** Errors in the measurement of plasma free testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2014-5
10. **Boots LR, Potter S, Azziz R.** Measurement of total testosterone levels using commercially available kits: high degree of between-kit variability. *Fertil Steril* 1998; 69:286-92.
11. **Fuqua JS, Sher ES, Migeon CJ, et al.** Assay of plasma testosterone during the first six months of life: importance of chromatographic purification of steroids. *Clin Chem* 1995; 41:1146-9
12. **Luppa P, Neumeir D.** Effects of SHBG on no-extraction immunoassay for testosterone. *Clin Chem* 1990; 36:172-3.
13. **Sánchez-Carbayo M, Mauri M, Altayate R, et al.** Elecsys testosterone assay evaluated. *Clin Chem* 1998; 44:1744-6.
14. **Qiao FY, Lauritzen C.** Significance of sex hormone binding globulin and free androgen index in the estimation of androgenic cases. *J Tongji Med Univ* 1990; 10:124-8
15. **Morley JE, Patrick P, Perry HM.** Evaluation of assay available to measure free testosterone. *Metabolism* 2002; 51:554-9
16. **Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM.** A critical evaluation of sample methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3666-72
17. **Brannian JD, Long P, Kreger DO.** Is the free androgen index a useful clinical maker in male patients? *S D J Med* 1998; 51:449-51

18. **Morimoto I, Izumi M, Nagataki S, et al.** Free testosterone Index: comparison with plasma free testosterone. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 1986; 62:797-806
19. **Vermeulen A, Stoica T, Verdonck L.** The apparent free testosterone concentration: an index of androgenicity. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33:759-66
20. **Philips GB, Jing TY, Resnick LM, et al.** Sex hormones and hemostatic risk factors for coronary heart disease in men with hypertension. *J Hypertension* 1993; 11:699-702
21. **Alexopoulou O, Jamart J, Maiter D et al.** Erectile dysfunction and lower androgenicity in type 1 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2001; 27:329-36
22. **Betancourt-Albrecht M, Cunningham GR.** Hypogonadism and diabetes. *Diabetes Metab* 2003; 15(Suppl4):S14-20
23. **Van Dam EW, Dekker JM, Lentjes EG, et al.** Steroids in adult men with type 1 diabetes: A tendency to hypogonadism. *Diabetes Metab* 2003; 26:1812-8.
24. **NCCLS Document C28-A.** How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline 1995; 15-20

Per corrispondenza a:

Dr.ssa Simona Ferraro  
Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche  
Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità  
Corso Mazzini 18  
28100 NOVARA  
Tel.0321.3733564  
Fax.0321.3733516  
e-mail: labimm@maggioreosp.novara.it