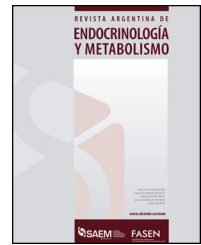




REVISTA ARGENTINA DE ENDOCRINOLOGÍA Y METABOLISMO

www.elsevier.es/raem



Monografía

Dificultades técnicas en el dosaje de testosterona



María Andrea Dacunda, María Antonella D'Amico, María Silvia de la Vega,
Lorena Elizabeth Gomez, Nicolás Eduardo Jaeggi, María del Rosario Navia,
Carolina Beatriz Yulán, Andrea Kozak y Gabriela Ruibal*

Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 15 de septiembre de 2015

Aceptado el 31 de mayo de 2016

On-line el 21 de julio de 2016

Palabras clave:

Testosterona

Inmunoanálisis

Hiperandrogenismo

R E S U M E N

Objetivo: Análisis bibliográfico de las limitaciones y dificultades técnicas en el dosaje de testosterona total (TT).

Materiales y métodos: Revisión de trabajos publicados en diferentes bases de datos desde 2003 hasta el 2014 (PubMed, Biblioteca Virtual de Salud, Cochrane). Evaluación y comparación del dosaje de TT sérica utilizando métodos disponibles en nuestro país, validados por LC-MS/MS y no validados por LC-MS/MS.

Resultados: Elaboración de una monografía en la que se evalúan los problemas técnicos en el dosaje de TT en la actualidad.

© 2016 Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Technical difficulties in the measurement of testosterone

A B S T R A C T

Objective: Bibliographic analysis of the constraints and technical difficulties in the total testosterone (TT) assay.

Methods: Review of articles published in various databases from 2003 to 2014. (PubMed, Health Library, Cochrane). Evaluation and comparison of serum TT assays using the different methods available in our country, validated or not validated by LC-MS/MS.

Results: Development of a monograph in which technical problems are evaluated in current TT assays.

© 2016 Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: gabyruibal@gmail.com, gabyruibal@fibertel.com.ar (G. Ruibal).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.raem.2016.06.002>

0326-4610/© 2016 Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La determinación de testosterona total sérica (TT) se realiza de rutina en laboratorios de análisis clínicos, con aplicaciones importantes para el diagnóstico y tratamiento de trastornos androgénicos de hombres, mujeres y niños, razón por la cual es importante contar con métodos precisos en todos los rangos de trabajo.

Desde los años 70, los métodos han sufrido modificaciones en pos de brindar rapidez y accesibilidad al dosaje de testosterona. Así, los primeros inmunoanálisis empleaban tritio como marcador, y usaban métodos de extracción y purificación del extracto, para eliminar proteínas o moléculas con estructuras similares que podrían interferir con la reacción y modificar, por consiguiente, la exactitud y la precisión. Estos ensayos fueron reemplazados por otros que usaban yodo como marcador (radioinmunoanálisis) y, más recientemente, se diseñaron diferentes plataformas automatizadas para inmunoanálisis que utilizan marcadores no radiactivos (fluorescentes, electroquimioluminiscentes, quimioluminiscentes).

Estos avances permitieron la automatización y posibilitaron que sea una práctica de rutina rápida y accesible en el laboratorio; aun así, no se ha logrado un aumento en la sensibilidad, especialmente a valores bajos, que se corresponden con poblaciones de niños y mujeres¹.

Por otro lado, no debemos perder de vista que la reactividad cruzada de compuestos endógenos con estructura similar, así como exógenos (drogas, esteroides anabólicos y glucocorticoides sintéticos) podrían contribuir a la baja especificidad de estos inmunoanálisis.

Las dificultades expuestas de esta falta de sensibilidad y especificidad son fuertes² y han sido demostradas por distintos grupos de trabajo y conducido a la American Endocrine Society (Sociedad Americana de Endocrinología) a difundir un documento con su posición sobre el tema³.

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), en colaboración con la Sociedad de Endocrinología, realizó un taller en el año 2008 para discutir las preocupaciones y desafíos en los análisis de testosterona. En vista de las recomendaciones de los participantes, el CDC comenzó el programa de estandarización hormonal con un enfoque inicial en el dosaje de testosterona⁴.

Cabe destacar la importancia de la estandarización, ya que conduce a mediciones precisas y fiables y lleva a beneficios como apoyar al establecimiento de guías clínicas y unificar el uso de rangos de referencia de testosterona entre ensayos.

Nuestro grupo de trabajo ha recopilado publicaciones sobre las limitaciones técnicas en el dosaje de rutina de testosterona —medidas en equipos automatizados— disponibles en nuestro país y comparadas con datos obtenidos mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem y dilución isotópica-cromatografía de gases seguida de espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS e ID/GC-MS). Estos trabajos han sido revisados, analizados y ordenados a fin de poder mostrar cuál es nuestra realidad actual.

Importancia clínica en la medición de testosterona total

La evaluación del análisis de testosterona en hombres adultos se utiliza primordialmente para diagnosticar hipogonadismo. También se recomienda en el seguimiento de pacientes con cáncer de próstata metastásico tratados con análogos de la hormona liberadora de gonadotropina o con terapia antiandrogénica².

En mujeres adultas, la medición de TT se utiliza para evaluar estados de hiperandrogenismo (alopecia, acné o hirsutismo), para excluir tumores relacionados con ellos y ha demostrado tener un valor predictivo para la detección de tumores secretores de andrógenos de origen ovárico².

En niños, la concentración de TT circulante se determina principalmente para acompañar (junto a otros parámetros) al diagnóstico, tratamiento y asignación de género de recién nacidos o niños pequeños con genitales ambiguos. Se utiliza en la adolescencia para el seguimiento de los niños con desarrollo precoz o retraso puberal².

Métodos disponibles para dosar testosterona total

Métodos directos

Inicialmente los radioinmunoanálisis (RIA) eran los métodos de elección para el dosaje de TT, pero actualmente han sido desplazados por inmunoanálisis que son técnicamente rápidos, sencillos, están disponibles en plataformas automatizadas y permiten procesar simultáneamente un elevado número de muestras, como son los enzimoanálisis (ELISA), la quimioluminiscencia (QLIA) y la electroquimioluminiscencia (EQLIA).

Estos tienen como inconveniente que pueden subestimar o sobrestimar la concentración de TT, ya que son susceptibles al efecto matriz, poseen baja precisión a valores bajos y, en caso de RIA, generan residuos radiactivos, además de que no se cuenta con valores de referencia comparables para las distintas metodologías³.

Métodos con extracción: radioinmunoanálisis y cromatografía

Los métodos de 2 pasos como RIA después de extracción de la muestra con solvente permiten incrementar la especificidad. Los intervalos de referencia en las distintas poblaciones están debidamente documentados.

Son laboriosos y requieren gran experiencia técnica. Además, se utilizan solventes orgánicos y compuestos radioactivos, que conllevan tener que contar con instalaciones especiales y mecanismos bioseguros de eliminación de desechos. Son susceptibles al efecto matriz.

Métodos de segunda generación

Son métodos nuevos, por lo que hay pocos estudios en los que se evalúen su precisión y exactitud. En un estudio realizado

por Groenestege et al.⁵ se compararon la exactitud de ensayos de primera y segunda generación antes y después de la extracción de la muestra y observaron que el método de segunda generación posee un mejor coeficiente de correlación (r) que su predecesor. Coeficientes que mejoran luego de la extracción, con lo que se demuestra que estos métodos aún sufren interferencias y que su especificidad debe ser mejorada.

Cromatografía líquida/gaseosa - Espectrometría de masa (método de referencia)

Son precisos y exactos, realizan la identificación y cuantificación del analito y permiten identificar en una única muestra varios esteroides.

Son relativamente caros y requieren estandarización. Para dosar testosterona se utilizan diversos pasos de extracción y de derivación, los cuales podrían sumar errores.

El método de dilución isotópica-cromatografía de gases seguida de espectrometría de masa en tándem (ID/GC-MS) no sufre reactividad cruzada ni efecto matriz, por lo que es utilizado como método de referencia en la evaluación de los inmunoanálisis que realizan dosaje de hormonas esteroideas².

Los ensayos que realizan extracción y cromatografía previa a espectrometría de masas probablemente proporcionen resultados más reales.

Las recomendaciones actuales indican que la *performance* de los inmunoanálisis a valores bajos (mujeres, niños y hombres hipogonádicos) no son buenas, por lo que deberían ser usados con precaución y, en el ámbito de investigación, se deberían emplear ensayos de LC/MS-MS para esteroides sexuales.

Determinación de testosterona total en 3 grupos de trabajo

Los ensayos que dosan TT sérica se ven afectados por varios factores:

- Ritmo circadiano, ritmo estacional, dimorfismo sexual, edad y manifestación de alguna enfermedad.
- Esteroides de estructura similar a la TT y en elevada concentración en circulación pueden interferir con el ensayo.
- La ausencia de patrón de referencia para medir TT.
- Falta de rangos de referencias adecuados.

Hombres adultos

Taieb et al.² dosaron TT por 10 inmunoanálisis (Architect i2000, Vidas, Immulite 2000, Elecsys 2010, RIA Inmunotech, Coat A-Count DPC, ACS- 180, Inmuno-1, Vitros y Auto Delfia) y por ID/GC-MS, en 50 hombres, 55 mujeres y 11 niños.

Luego de analizar los datos obtenidos, concluyeron que para la población de hombres adultos algunos inmunoanálisis subestiman el valor de TT en un 12% respecto del obtenido por ID/GC-MS.

En ese mismo sentido, Wang et al.⁶ realizaron un estudio con 62 hombres eugonádicos y 60 hombres hipogonádicos, midieron sus niveles de TT por 4 inmunoanálisis

automatizados y 2 manuales, compararon los resultados con los obtenidos por LC/MS-MS y observaron que entre estos inmunoanálisis y LC/MS-MS existe buena correlación, pudiendo presentar diferencias que rondan el $\pm 20\%$, variación que no representa relevancia clínica para hombres adultos, por lo que serían capaces de distinguir entre valores correspondientes a hombres eugonádicos e hipogonádicos.

A conclusiones similares llegó un grupo del Colegio de Patólogos de Estados Unidos³, quienes proveyeron un control de calidad externo para testosterona entre distintos laboratorios, a partir del cual calcularon los coeficientes de variación (CV) para los distintos métodos, y donde observaron que, a medida que aumentaba la concentración de TT, disminuía el CV.

Así y frente a una primera impresión, pareciera que los inmunoanálisis poseen un buen desempeño a rangos altos y pueden ser confiables para el dosaje de TT en hombres, es decir, a dosis altas.

Mujeres adultas

Scaglia et al.⁷ midieron testosterona por distintos inmunoanálisis (AxSYM, Architect, Immulite, Elecsys, Vidas, RIA S, RIA DSL, DiaS e in-H) y por LC-MS/MS en 24 mujeres normales (MN) y en 15 mujeres hirsutas (MH). En dicho trabajo observaron que:

- Los valores de TT (rango, mediana, media y DE) mostraron una gran dispersión en ambos grupos de mujeres, tanto en los laboratorios que utilizan distintas técnicas como en aquellos que usan la misma.
- En todos los métodos utilizados se subestimó el número de pacientes con hiperandrogenismo en comparación con los datos arrojados por el LC-MS/MS.
- La ecuación obtenida del análisis de regresión de Deming en ambos grupos fue mayor a 1 para todos los métodos, excepto en el in-H. Se evidenció gran dispersión, lo que indica que todos los métodos no se correlacionan adecuadamente con el LC-MS/MS.
- El análisis de la prueba no paramétrica de Wilcoxon, realizado para comparar las concentraciones de TT medidas por cada uno de los métodos con LC-MS/MS, reveló diferencias significativas ($p < 0,05$) en el grupo MN por AxSYM, Architect, RIA S, DiaS y Vidas, y en MH por AxSYM, RIA S y DiaS.
- El análisis de Bland y Altman también mostró falta de concordancia entre los resultados obtenidos por LC-MS/MS y los diferentes inmunoanálisis, tanto para MN como para MH, lo que demuestra su elevada imprecisión.

En un estudio publicado, realizado por Taieb et al.², compararon los valores de TT medidos por inmunoanálisis vs ID/GC-MS, observando que 7 de 10 inmunoanálisis sobrestiman la concentración de testosterona en muestras de mujeres.

Basándonos en los resultados que obtuvieron ambos trabajos, ningún inmunoanálisis actualmente en uso presenta suficiente precisión para ser elegido para el estudio de concentraciones de testosterona menores a 0,5 ng/mL (1,7 nmol/l) como es indispensable para el caso en el que la muestra en estudio sea de mujeres.

Niños

Kushnir et al.⁸ definieron valores de referencia en niños por estadios Tanner y por edad por LC-MSMS. De acuerdo a los resultados, las concentraciones de testosterona en rango adulto se alcanzan en niñas al llegar al estadio Tanner 3 y en varones al llegar a los estadios 4-5. En estadios inferiores, los valores de testosterona llegan a ser tan bajos como 0,016 ng/ml (0,55 nmol/l). Sin embargo, y a pesar de la importancia de la medición de testosterona en niños, no disponemos de métodos con la necesaria sensibilidad y exactitud para medir estas concentraciones.

Taieb et al. dosaron testosterona en 11 niños y niñas por ID/GC-MSMS y 10 inmunoanálisis. En todas menos en 2 muestras, las concentraciones fueron menores al límite de detección por ID/GC-MSMS.

Además, 8 de los 10 inmunoanálisis no tuvieron la sensibilidad suficiente y los 2 restantes no arrojaron resultados comparables entre sí.

Este grupo concluye que ninguno de estos inmunoanálisis es suficientemente seguro para investigar concentraciones de testosterona en los rangos bajo y muy bajo².

En el trabajo realizado por Groestenege se midió la testosterona en hombres, mujeres y niños, y los resultados se dividieron en 2 grupos para su análisis; superiores a 1,15 ng/ml (4 nmol/l) e inferiores a este valor.

Las mediciones de testosterona se realizaron por LC-MSMS y se compararon con los resultados obtenidos por 7 inmunoanálisis, antes y después de la extracción con dietil-éter.

En el rango bajo, el análisis estadístico mostró que los coeficientes de correlación son relativamente pobres para medir testosterona en muestras sin extracción previa⁵.

Moal et al. midieron la testosterona en 70 mujeres y niños por LC-MSMS y por 5 inmunoanálisis. Tres RIA manuales (Immunotech, Schering CIS y Spectria Orion) y 2 inmunoanálisis automatizados (Liaison y Roche).

Los resultados no difieren de lo descrito previamente: bajos coeficientes de correlación, sobrestimación de los valores de testosterona y alta dispersión de resultados, por lo cual concluyen que ninguno de los 5 métodos es suficientemente seguro para medir bajas concentraciones de testosterona como las que se encuentran en mujeres y niños⁹.

Conclusión

La dificultad en el dosaje de TT se observa en diferentes puntos:

La elección del método de dosaje utilizable está sujeto a los recursos con los que cuenta cada laboratorio.

Los diferentes métodos de dosaje que se encuentran en el mercado no son comparables entre sí. Principalmente a bajas concentraciones de TT en su mayoría carecen de sensibilidad y precisión, con lo cual se ve afectado el diagnóstico y seguimiento de enfermedades hipogonádicas en hombres y particularmente en aquellas de mujeres y niños. A la fecha no se dispone de un patrón internacional de referencia y no se cuenta con valores de referencia para las distintas poblaciones en estudio.

Ante estas evidencias nos planteamos, como primera medida, la necesidad de desarrollar 2 técnicas diferentes para el dosaje de TT: una para hombres eugonádicos, en la que la concentración hormonal es elevada y la mayoría de los métodos tienen un desempeño confiable; y otra técnica, más sensible, para el dosaje de TT en niños, mujeres y hombres hipogonádicos, con la que se observa la mayor disparidad entre métodos, ya que las concentraciones hormonales son considerablemente más bajas en estas poblaciones respecto a la primera mencionada.

Si bien el *gold standard* es el LC-MS/MS, existen kits comerciales validados por CDC que utilizan como referencia a este último, que llegan a cambiar la confiabilidad de los resultados a un límite de 0,5 ng/ml, y los hace aceptables para su utilización en los laboratorios clínicos. De igual forma, es necesario tener prudencia en la interpretación de resultados bajos, buscar siempre una buena correlación con la clínica que presentan los pacientes y realizar el seguimiento con una misma metodología, hasta que todos los laboratorios puedan contar con técnicas sensibles y precisas que dependan del rango de TT de trabajo, o bien hasta que el uso de métodos como el LC-MS/MS lleguen a ser accesibles a los laboratorios de rutina y su uso pueda ser generalizado para el dosaje de esteroides.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vieira JGH, Nakamura OH, Ferrer CM, Tachibana TT, Endo MH, Carvalho VM. Importância da metodologia na dosagem de testosterona sérica: comparação entre um imunoensaio direto e um método fundamentado em cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massa em tándem (Hplc/Ms-Ms). *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52/6:1050-5.
2. 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.

3. 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.
4. Nigel CJ. Testosterone measurement-standardizing testing to increase accuracy [consultado 2 Dic 2014]. Disponible en: <http://education.questdiagnostics.com/insights/38>.
5. Groenestege WM, Bui HN, Kate JT, Menheere PP, Oosterhuis WP, Vader HL, et al. Accuracy of first and second generation testosterone assays and improvement through sample extraction. *Clin Chem.* 2012;58:1154-6.
6. Wang C, Don HC, Demers LM, Starcevic B, Swerdloff R. 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.
7. Scaglia HE, Aquilano DR, Buccini G, Chichizola C, Corazza N, Corthey C, et al. Quantification of Testosterone (t) by 8 immunoassays and by liquid chromatography -tandem mass spectrometry (lc-msms) in normal and hirsute women. A multicenter study. *Rev Arg Endocrinol Metabol.* 2012;49.
8. Kushnir M, Blamires T, Rockwood AI, Roberts WI, Yue B, Erdogan E, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals. *Clin Chem.* 2010;56:1138-47.
9. Moal V, Mathieu E, Reyner P, Malthiery Y, Gallois Y. Low serum testosterone assayed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison with five immunoassay techniques. *Clin Chim Acta.* 2007;386:12-9.