

Methodische Aspekte zur Bestimmung der Testosteronkonzentration als Biomarker der Gesundheit des Mannes

Challenges in the measurement of serum testosterone concentrations as a biomarker of men's health

Robin Haring*, Christin Spielhagen
und Matthias Nauck

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin,
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Greifswald,
Deutschland

Zusammenfassung

Die Bestimmung der Testosteronkonzentration im Serum steht in den letzten Jahren zunehmend im Fokus der Andrologie. Zahlreiche Beobachtungsstudien präsentierten Zusammenhänge zwischen niedrigen Serum Testosteronkonzentrationen und inzidenten kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. erhöhtem Mortalitätsrisiko. Darüber hinaus sind niedrige Serum Testosteronkonzentrationen ein entscheidendes diagnostisches Kriterium des Altershypogonadismus. Aufgrund ihrer hohen Validität und Messfrequenz ersetzen massenspektroskopische Verfahren zunehmend die bisher gebräuchlichen Immunoassays zur Testosteronmessung, und werden als „Goldstandard“ zur Sexualhormonmessung diskutiert. Der Artikel stellt verschiedene Einflussfaktoren der Bestimmung der Testosteronkonzentration vor und gibt praktische Hinweise für die Interpretation der Ergebnisse.

Schlüsselwörter: Androgene; Biomarker; Immunoassay; Massenspektrometrie; Testosteron.

Abstract

Male testosterone concentrations gained recent attention in the field of andrology. Various epidemiological cohort studies presented associations of low serum testosterone concentrations with incident cardiovascular risk factors and increased

mortality risk. Furthermore, low serum testosterone concentrations are integral part for the diagnosis of late-onset hypogonadism. Because of their high validity and throughput, mass spectrometry assays have replaced conventional immunoassays for testosterone measurement, and are believed to become the “gold standard” for sex hormone quantitation. This article will focus on challenges in the measurement of serum testosterone concentrations and will provide practical information on the interpretation of serum testosterone measurements.

Keywords: androgens; biomarker; immunoassay; mass spectrometry; testosterone.

Einleitung

In den letzten Jahren hat sich im Bereich der Andrologie ein zunehmendes Interesse an der Definition des Hypogonadismus bzw. des älter werdenden Mannes entwickelt. Die Begriffe „Aging Male“, PADAM (partielles Androgendefizit des alternden Mannes), Klimakterium virile oder Andropause beschreiben die durch verminderte Testosteronsekretion bedingten hormonellen Veränderungen und hieraus resultierende körperliche und psychische Symptome.

Obwohl es keine spezifischen Symptome des Androgenmangels gibt, werden körperliche Beschwerden wie erktile Dysfunktion, Libidominderung, Muskelschwäche oder Osteopenie sowie psychosoziale Aspekte wie Fatigue oder Depressionen als Testosteron-assoziiert diskutiert [1]. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren zahlreiche Beobachtungsstudien vorgestellt, die eine inverse Korrelation zwischen Testosteronkonzentration und bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren wie Adipositas [2], Fettstoffwechselstörungen [3] und Steatosis hepatis [4] zeigten. Prospektive Beobachtungsstudien konnten belegen, dass eine niedrige Testosteronkonzentration im Serum als Biomarker für die Entwicklung einer Dyslipidämie [3], eines Metabolischen Syndroms [5], Typ 2 Diabetes [6] oder Hypertonie [7] angesehen werden kann bzw. niedrige Testosteronkonzentration ein potentieller Risikofaktor kardiovaskulärer Endpunkte [8] und erhöhter Sterblichkeit [9] beim Mann sind (Abbildung 1). Zur Beurteilung der Richtigkeit von Testosteronmessungen und deren klinischer Belastbarkeit ist jedoch die Kenntnis verschiedener biologischer,

*Korrespondenz: Dr. rer. med. Robin Haring
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Ferdinand-Sauerbruch-Straße
17475 Greifswald
Telefon: +49-3834-8619656
Fax: +49-3834-865502
E-Mail: robin.haring@uni-greifswald.de

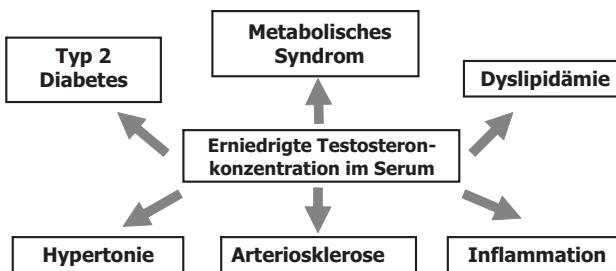


Abbildung 1 Niedrige Testosteronkonzentration als Biomarker verschiedener kardiometabolischer Risikofaktoren und Endpunkte.

präanalytischer und analytischer Einflussfaktoren erforderlich (Tabelle 1).

Biologische Einflüsse auf die Testosteronmessung

Testosteron ist das dominierende Sexualhormon des Mannes und wird lebenslang im Hoden gebildet [10]. Im Serum ist Testosteron überwiegend an sexualhormonbindendes Globulin (SHBG) und Albumin gebunden, nur ca. 2% liegen in freier Form vor. Neben geringen, jedoch nachweisbaren jahreszeitlichen Schwankungen [11], unterliegt die mittlere Testosteronkonzentration einer ausgeprägten zirkadianen Rhythmis mit morgendlich höheren und abendlich um 30 bis 50% niedrigeren Konzentrationen [12, 13]. Daher empfehlen aktuelle Leitlinien zur Diagnostik eines Testosteronmangels grundsätzlich eine zur gleichen Tageszeit wiederholte, morgendliche Blutentnahme zwischen 07.00 und 11.00 Uhr [14]. Der Nüchternstatus zum Zeitpunkt der Blutentnahme ist ein weiterer biologischer Einflussfaktor [15]. Eine Interventionsstudie konnte zeigen, dass die orale Standardgabe von 75 g Glukose die Nüchtern-Testosteronkonzentration für bis zu drei Stunden um 15% reduziert [16]. Chronischer Stress und/oder eine negative subjektive Gesundheitseinschätzung können ebenfalls die Testosteronkonzentration senken [17].

Die individuelle Testosteronkonzentration unterliegt somit einem erheblichen Lebensstileneinfluss. Gesunde Ernährung, Gewichtskontrolle sowie sportliche Aktivität können den al-

tersbedingten, kontinuierlichen Abfall männlicher Testosteronkonzentrationen positiv beeinflussen [18]. Dieser beträgt ab dem 40. Lebensjahr ca. 1% bis 2% pro Jahr [19]. Kommen Begleiterkrankungen oder -medikation hinzu, ist der Abfall der Testosteronkonzentration deutlich ausgeprägter [20]. Die physiologische Serum-Testosteronkonzentration ist somit altersabhängig und unterliegt einer Schwankungsbreite zwischen 6,2 und 32,3 nmol/L [21]. Mit zunehmendem Alter sinkt insbesondere der freie Anteil des Testosterons im Serum, bedingt durch den SHBG-Anstieg, zusätzlich ab. Insgesamt weist die Testosteronkonzentration eines Individuums eine zufällige Verteilung auf, die um seinen individuellen, diagnostisch relevanten Mittelwert streut. Diese intra-individuelle Variabilität beträgt ca. 9% [22]. Da die intra-individuelle Variabilität naturgemäß nicht verändert werden kann, liegen die Potenziale einer Qualitätsverbesserung der analytischen Präzision in der Optimierung präanalytischer und analytischer Faktoren.

Präanalytische Einflüsse auf die Testosteronmessung

Um präanalytische Einflussfaktoren zu minimieren, ist eine standardisierte Blutentnahmetechnik unverzichtbar. Vor der Punktion sollte der Patient 15 min liegen oder sitzen und die Venenstauung sollte eine Minute nicht überschreiten. Meist wird Serum als Probenmaterial verwendet. So ist z.B. der Siemens Centaur Assay (Siemens Medical Solutions Diagnostics) nur für Testosteronmessungen im Serum validiert [23]. Auch der sofortige Probenversand hat einen Einfluss. Proben die länger als 24 h bei Raumtemperatur gelagert wurden, weisen eine erhöhte Testosteronkonzentration auf [24]. Nahezu unverändert bleibt die Testosteronkonzentration bei bis zu sechsstündiger Probenlagerung bei Raumtemperatur oder bei bis zu 48-stündiger Probenlagerung bei 4 °C [23]. Auch eine Langzeitlagerung von über 40 Jahren bei –25 °C hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Zuverlässigkeit der anschließenden Testosteronmessungen gezeigt [25, 26]. Obwohl Herstellerangaben zufolge das wiederholte Auftauen und Einfrieren der zu vermessenden Serumproben nicht empfohlen wird, hat eine Studie auch nach zwölf Zyklen Einfrieren/Auftauen stabile Testosteronkonzentrationen gezeigt [27].

Tabelle 1 Kriterien der analytischen Leistungsfähigkeit der Testosteronmessung.

Einflussfaktoren der Testosteronmessung		
Biologische Faktoren	Präanalytische Faktoren	Analytische Faktoren
Kontinuierlicher, physiologischer Abfall männlicher Testosteronkonzentration	Standardisierte Blutentnahmetechnik	Kreuzreaktivitäten
Intra-individuelle Variabilität bedingt durch allgemeinen Gesundheitszustand und Komorbiditäten	Probenmanagement	Variationskoeffizient (Sensitivität / Spezifität)
Ausgeprägte zirkadiane Rhythmis	Probenlagerung	Assay-Plattform
Nüchternstatus	Reagenzien	

Analytische Einflüsse auf die Testosteronmessung

Die heute in der Routinediagnostik eingesetzten und weitgehend automatisierten Verfahren zur Analyse von Serum-Testosteronkonzentrationen basieren auf immunologischen Methoden, die sich lediglich durch verschiedene Prinzipien, z.B. homogener oder heterogener Ansatz, und durch die Messtechnik zur Quantifizierung der immunologischen Reaktion unterscheiden. Verwendete Detektionsmarker sind Isotope (RIA), Enzyme (EIA, ELISA), Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzverbindungen (z.B. ECLIA) [28]. Zentrale Qualitätskriterien zur Beurteilung der diagnostischen Leistungsfähigkeit der Testosteronmessung sind deren Selektivität, die bei den Immunverfahren entscheidend von der Spezifität der verwendeten Antikörper bestimmt wird. Eine absolute Selektivität gibt es aber selbst bei modernen Immunoassays zur Testosteronmessung nicht, wobei Kreuzreaktivitäten zwischen 1,9% und 5,4% von geringer praktischer Bedeutung sind [29].

Der Variationskoeffizient, als Maß der Reproduzierbarkeit eines Analyseergebnisses, liegt zwischen ca. 2% im oberen und 7,5% im subnormalen Messbereich der Testosteronkonzentration, wobei immunologische Verfahren im Entscheidungsbereich von 12 nmol/L einen Variationskoeffizienten von 5% bis 7% erreichen [29, 30]. Die derzeit international anerkannte Referenzmethode, mit der die Referenzstandardisierung der Immunverfahren für die Testosteronbestimmung vorgenommen wird, ist die Isotopenverdünnungs-Massenpektrometrie. Nach den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen darf die maximal zulässige Abweichung eines Testosteronmesswerts vom Referenzmethodenwert 42% betragen, ein Zielbereich der beim letzten Ringversuch im Januar 2006 von 20% der teilnehmenden Laboratorien verfehlt wurde [29]. Der im Jahr 2008 durchgeführte Ringversuch des College of American Pathologists (CAP) belegt ebenfalls den erheblichen Mangel an Spezifität der gebräuchlichen Immunverfahren für die Testosteronbestimmung. Der niedrigste gemessene Mittelwert (52,6 ng/dL) unterschied sich vom höchsten gemessenen Mittelwert (148,7 ng/dL) um den Faktor 2,8. Der mit Hilfe massenspektroskopischer Methoden gemessene Faktor lag dagegen bei 1,4 (low pool) bzw. 1,2 (high pool) [31]. Eine andere Vergleichsstudie zeigte, dass bis zu 50% der durch einzelne Immunoassays bestimmten Testosteronkonzentrationen außerhalb eines $\pm 20\%$ -Bereichs um den durch Massenspektrometrie gemessenen, exakten Wert lagen [32].

Die angesichts dieser Differenzen geäußerten Befürchtungen bezüglich der Validität immunologischer Testosteronmessungen in Populationsstudien [33] wurden jedoch durch mehrere Vergleichsstudien widerlegt [30, 34]. Aber aufgrund der mitunter substanzialen Differenzen in den gemessenen absoluten Testosteronkonzentrationen [30, 34] sind immunologische Verfahren für den diagnostisch interessanten niedrigen Messbereich unzureichend [32, 35, 36]. Darüber hinaus weisen die präziseren massenspektroskopischen Verfahren im Vergleich zur immunologischen Testosteronmessung eine

erheblich geringere Intra- und Interlaborvariabilität auf [37], weshalb diese zunehmend als Goldstandard für die klinische und epidemiologische Testosteronmessung betrachtet werden [14, 32, 38–40]. Das unlängst gestartete „Steroid hormone standardization project“ unternimmt dabei verschiedene Aktivitäten zur Standardisierung von Testosteronmessungen, Etablierung von Referenzbereichen und Erhöhung der Vergleichbarkeit von Testosteronmessungen unabhängig von Methodik, Messzeitpunkt und Messort [41].

Die Bestimmung von freiem oder bioverfügbarem Testosteron kann die Diagnose eines Testosteronmangels unterstützen. Die Messung des freien Testosterons mittels Äquilibrium-dialyse, des bioverfügbaren Testosterons mittels Ammonium-sulfatpräzipitation, bzw. beider Androgene mittels Massenspektroskopie ist jedoch für die Routinediagnostik zu aufwendig bzw. unpraktikabel und wird bisher primär für Forschungszwecke oder in Referenzlaboratorien eingesetzt [42]. Sogenannte Analogimmunoassays zur direkten Messung des freien Testosterons sollten aufgrund ihrer unzuverlässigen Messung nicht eingesetzt werden [43, 44]. Bioverfügbares und freies Testosteron können aber, unter Annahme einer konstanten Albuminkonzentration, mithilfe verschiedener mathematischer Algorithmen aus den Messwerten von Gesamttestosteron und SHBG kosten- und zeiteffektiv berechnet werden [45]. Eine Vergleichsstudie zwischen den derzeit etablierten Algorithmen zeigte zwar, dass das berechnete freie Testosteron gut mit den Messungen der Äquilibrium-dialyse korreliert [28, 46], die geschätzten Werte aber ohne eine laborspezifische, „In-house“-Validierung sehr kritisch bewertet werden sollten [42].

Schlussfolgerung

Zusammenfassend müssen immunologische Testosteronmessungen, trotz ihrer Richtigkeit im Zielkonzentrationsbereich gesunder Männer, im niedrigen Konzentrationsbereich (vor allem bei komorbidem Männern, Frauen und Kindern) aufgrund der unzureichenden diagnostischen und analytischen Qualität zurückhaltend beurteilt werden. Zudem sollten bei der Interpretation der gemessenen Testosteronkonzentrationen verschiedene biologische und präanalytische Einflussfaktoren berücksichtigt werden. Da die Diagnose des Altershypogonadismus auf mindestens drei sexuellen Symptomen und wiederholt detektierten niedrigen Serum-Testosteronkonzentrationen basiert [1], ist die Interpretation dieser gemessenen Testosteronkonzentrationen ein entscheidendes diagnostisches Kriterium. Um eine valide klinische Diagnose treffen zu können, bietet Tabelle 1 einen Überblick über die verschiedenen Einflussfaktoren der Testosteronmessung (vgl. Tabelle 2 in [23] oder [47]).

Wird eine Testosterontherapie erwogen, müssen die Vorteile und Nachteile sowie Risikofaktoren im Hinblick auf die Prostata [48] und andere Organe [49] mit dem Patienten diskutiert werden. Die Effekte der Testosterontherapie müssen überwacht werden. Wenn keine Verbesserung der Symptome des Testosteronmangels unter Testosteronsubstitution eintritt, sollte die Behandlung abgesetzt und der Patient nochmals auf andere mögliche Ursachen seiner klinischen Beschwer-

den untersucht werden [50]. Neben der Frage, welche Testosteronkonzentrationen klinisch relevant sind [51], ist die Wirksamkeit der Testosterongabe derzeit als zweifelhaft einzuschätzen [52]. Längerfristige Erkenntnisse (d.h. >3 Jahre) zu deren Nutzen und Risiken liegen nicht vor, weshalb in der Zukunft eine Intensivierung der klinischen Studien und der Grundlagenforschung auf diesem Gebiet notwendig ist.

Als gesichert gelten dagegen die Ergebnisse zahlreicher prospektiver Beobachtungsstudien, die darauf schließen lassen, dass niedrige Testosteronkonzentrationen vor allem als Biomarker für den allgemeinen Gesundheitszustand des Mannes und/oder aus dem Gleichgewicht geratene Stoffwechselvorgänge eine Rolle spielen. Vor diesem Hintergrund könnten Testosteronmessungen im Zusammenspiel mit bereits bestehenden Präventionsstrategien helfen, die spätere Entwicklung subklinischer und manifest er kardiovaskulärer Erkrankungen zu verhindern und Männer noch gezielter für ein gesundheitsbewusstes Verhalten zu sensibilisieren und motivieren.

Literatur

- Wu FC, Tajar A, Beynon JM, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, et al. Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N Engl J Med* 2010;363:123–35.
- Friedrich N, Rosskopf D, Brabant G, Völzke H, Nauck M, Wallaschofski H. Associations of anthropometric parameters with serum TSH, prolactin, IGF-I, and testosterone levels: results of the study of health in Pomerania (SHIP). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010;118:266–73.
- Haring R, Baumeister SE, Völzke H, Dörr M, Felix SB, Kroemer HK, et al. Prospective association of low total testosterone concentrations with an adverse lipid profile and increased incident dyslipidemia. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2010, Jun 17. Epub ahead of print.
- Völzke H, Aumann N, Krebs A, Nauck M, Steveling A, Lerch MM, et al. Hepatic steatosis is associated with low serum testosterone and high serum DHEAS levels in men. *Int J Androl* 2010;33:45–53.
- Haring R, Völzke H, Felix SB, Schipf S, Dörr M, Rosskopf D, et al. Prediction of metabolic syndrome by low serum testosterone levels in men: results from the study of health in Pomerania. *Diabetes* 2009;58:2027–31.
- Schipf S, Haring R, Friedrich N, Nauck M, Lau K, Alte D, et al. Low total testosterone is associated with increased risk of incident Type 2 diabetes mellitus in men: Results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Aging Male* 2010; Nov 2. Epub ahead of print.
- Torkler S, Wallaschofski H, Baumeister SE, Völzke H, Dörr M, Felix SB, et al. Inverse Association Between Total Testosterone Concentrations, Incident Hypertension, and Blood Pressure. *Aging Male* 2010; Nov 19. Epub ahead of print.
- Maggio M, Basaria S. Welcoming low testosterone as a cardiovascular risk factor. *Int J Impot Res* 2009;21:261–4.
- Haring R, Völzke H, Steveling A, Krebs A, Felix SB, Schoefl C, et al. Low serum testosterone levels are associated with increased risk of mortality in a population-based cohort of men aged 20–79. *Eur Heart J* 2010;31:1494–501.
- Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocrine Reviews* 2005;26:833–76.
- Svartberg J, Jorde R, Sundsfjord J, Bonaa KH, Barrett-Connor E. Seasonal variation of testosterone and waist to hip ratio in men: the Tromso study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3099–104.
- Diver MJ, Imtiaz KE, Ahmad AM, Vora JP, Fraser WD. Diurnal rhythms of serum total, free and bioavailable testosterone and of SHBG in middle-aged men compared with those in young men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;58:710–7.
- Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB. The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *J clin Endocrinol Metab* 2009;94:907–13.
- Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2536–59.
- Cameron JL, Helmreich DL, Schreihof DA. Modulation of reproductive hormone secretion by nutritional intake: stress signals versus metabolic signals. *Hum Reprod* 1993;8:162–7.
- Jeibmann A, Zahedi S, Simoni M, Nieschlag E, Byrne MM. Glucagon-like peptide-1 reduces the pulsatile component of testosterone secretion in healthy males. *Eur J clin invest* 2005;35:565–72.
- Halford C, Anderzen I, Arnetz B. Endocrine measures of stress and self-rated health: a longitudinal study. *J Psychosom Res* 2003;55:317–20.
- Haring R, Ittermann T, Völzke H, Krebs A, Zygmunt M, Felix SB, et al. Prevalence, incidence and risk factors of testosterone deficiency in a population-based cohort of men: results from the study of health in Pomerania. *Aging Male* 2010;13:247–57.
- Travison TG, Araujo AB, Kupelian V, O'Donnell AB, McKinlay JB. The relative contributions of aging, health, and lifestyle factors to serum testosterone decline in men. *J clin endocrinol metab* 2007;92:549–55.
- Carruthers M, Trinick TR, Wheeler MJ. The validity of androgen assays. *Aging Male* 2007;10:165–72.
- Friedrich N, Völzke H, Rosskopf D, Steveling A, Krebs A, Nauck M, et al. Reference ranges for serum dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone in adult men. *J Androl* 2008;29:610–7.
- Valero-Politi J, Fuentes-Arderiu X. Within- and between-subject biological variations of follitropin, lutropin, testosterone, and sex-hormone-binding globulin in men. *Clin Chem* 1993;39:1723–5.
- Wheeler MJ, Barnes SC. Measurement of testosterone in the diagnosis of hypogonadism in the ageing male. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69:515–25.
- Hammer EJ, Astley JP. Increase in serum testosterone following contact with blood cells. *Ann clin biochem* 1985;22:539–40.
- Bolelli G, Muti P, Micheli A, Sciajno R, Franceschetti F, Krogh V, et al. Validity for epidemiological studies of long-term cryoconservation of steroid and protein hormones in serum and plasma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:509–13.
- Stroud LR, Solomon C, Shenassa E, Papandonatos G, Niaura R, Lipsitt LP, et al. Long-term stability of maternal prenatal steroid hormones from the National Collaborative Perinatal Project: still valid after all these years. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:140–50.
- Bauman JE. Stability of radioimmunoassayable steroid and protein hormones after repeated freeze-thaw cycles. *Clin Chem* 1982;28:2336–7.
- Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Utility, Limitations, and Pitfalls in Measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:405–13.

29. Schönicke G, Junge M. Der Testosteronspiegel – Messung und analytische Bewertung. *Blickpunkt der Mann* 2006;4:19–22.
30. Hsing AW, Stanczyk FZ, Belanger A, Schroeder P, Chang L, Falk RT, et al. Reproducibility of serum sex steroid assays in men by RIA and mass spectrometry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1004–8.
31. Soldin SJ, Soldin OP. Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2009;55:1061–6.
32. Wang C, Catlin DH, Demers LM, Starcevic B, Swerdloff RS. Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:534–43.
33. Stanczyk FZ, Lee JS, Santen RJ. Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1713–9.
34. Dorgan JF, Fears TR, McMahon RP, Aronson Friedman L, Patterson BH, et al. Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. *Steroids* 2002;67:151–8.
35. 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.
36. Matsumoto AM, Bremner WJ. Serum testosterone assays—accuracy matters. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:520–4.
37. Vesper HW, Bhagat S, Wang C, Tai SS, Dodge LA, Singh RJ, et al. Interlaboratory comparison study of serum total testosterone [corrected] measurements performed by mass spectrometry methods. *Steroids* 2009;74:498–503.
38. Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren LJ, et al. Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA, and ASA recommendations. *J Androl* 2009;30:1–9.
39. Thienpont LM, Van Uytfanghe K, Blincko S, Ramsay CS, Xie H, Doss RC, et al. State-of-the-art of serum testosterone measurement by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2008;54:1290–7.
40. Stanczyk FZ, Clarke NJ. Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:491–5.
41. Vesper HW, Botelho JC. Standardization of testosterone measurements in humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:513–9.
42. de Ronde W, van der Schouw YT, Pols HA, Gooren LJ, Muller M, Grobbee DE, et al. Calculation of bioavailable and free testosterone in men: a comparison of 5 published algorithms. *Clin Chem* 2006;52:1777–84.
43. Rosner W. Errors in the measurement of plasma free testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2014–5.
44. Swerdloff RS, Wang C. Free testosterone measurement by the analog displacement direct assay: old concerns and new evidence. *Clin Chem* 2008;54:458–60.
45. Mazer NA. A novel spreadsheet method for calculating the free serum concentrations of testosterone, dihydrotestosterone, estradiol, estrone and cortisol: with illustrative examples from male and female populations. *Steroids* 2009;74:512–9.
46. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3666–3672.
47. Ceglarek U, Werner M, Kortz L, Korner A, Kiess W, Thiery J, et al. Preclinical challenges in steroid analysis of human samples. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:505–12.
48. Basaria S, Singh AB, Mac RP, Carter B, Lee MI, Cunningham GR. Managing the risks of prostate disease during testosterone replacement therapy in older men: recommendations for a standardized monitoring plan. *J Androl* 2003;24:299–311.
49. Basaria S, Covioello AD, Travison TG, Storer TW, Farwell WR, Jette AM, et al. Adverse events associated with testosterone administration. *N Engl J Med* 2010;363:109–22.
50. Nieschlag E, Wang C, Swerdloff R, Behre H, Hellstrom WJ, Gooren LJ, et al. Untersuchung, Behandlung und Überwachung des Altershypogonadismus (Late-onset hypogonadism) des Mannes: ISA-, ISSAM-, EAU-, EAA- und ASA-Empfehlungen. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2010;7:60–6.
51. McLachlan RI. Certainly more guidelines than rules. *J clin Endocrinol Metab* 2010;95:2610–3.
52. Isidori AM, Giannetta E, Greco EA, Gianfrilli D, Bonifacio V, Isidori A, et al. Effects of testosterone on body composition, bone metabolism and serum lipid profile in middle-aged men: a meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:280–93.