

La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio Italian Journal of Laboratory Medicine

La diagnostica di laboratorio delle malattie del surrene. Raccomandazioni pratiche per la sindrome di Cushing Laboratory diagnostics of adrenal diseases. Practice guidelines for Cushing's syndrome **SHORT TITLE: La diagnostica di laboratorio della sindrome di Cushing**

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	RIME-D-15-00017
Full Title:	La diagnostica di laboratorio delle malattie del surrene. Raccomandazioni pratiche per la sindrome di Cushing Laboratory diagnostics of adrenal diseases. Practice guidelines for Cushing's syndrome SHORT TITLE: La diagnostica di laboratorio della sindrome di Cushing
Article Type:	Review (Rassegna)
Section/Category:	Clinical Section
Keywords:	Cushing's syndrome Urinary free cortisol Late-night salivary cortisol Serum cortisol Dexamethasone suppression test Sindrome di Cushing Cortisolo libero urinario Cortisolo salivare notturno Cortisolo sierico Test di soppressione al desametasone
Corresponding Author:	Federica D'Aurizio, M.D. S.Maria degli Angeli Hospital, AAS5, Pordenone Pordenone, Pordenone ITALY
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	S.Maria degli Angeli Hospital, AAS5, Pordenone
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Federica D'Aurizio, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Federica D'Aurizio, M.D. Renato Tozzoli Romolo M Dorizzi Vincenzo Brescia Elisa Esposito Antonio Fortunato Luca Giovanella Gabriele Guzzaloni
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Cushing's syndrome comprises several signs and symptoms due to chronic exposure to high endogenous and exogenous levels of glucocorticoids. Most of the cases of

Cushing's syndrome are caused by ACTH secretion from pituitary tumors (Cushing's disease); some forms of Cushing's syndrome are caused by cortisol-secreting adrenal tumors. The most common clinical features are central obesity, striae rubrae, acne, hirsutism, muscle weakness, osteoporosis, gonadic dysfunctions (hypogonadotropic hypogonadism in male, oligo- or anovulatory cycles in females), blood hypertension, metabolic dysfunctions (diabetes mellitus and hyperlipidemia), psychiatric disorders (depression and psychosis). The subclinical forms are more common and are found in 5-20% of adrenal incidentaloma.

The review of the literature from 2009 to 2015 substantially confirms 2008 Endocrine Society guidelines: diagnostic odd ratio and number needed to diagnose prove that urinary free cortisol, late-night salivary cortisol and dexamethasone suppression test yield very satisfactory and comparable performances. The present practical recommendations of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine are consistent with those published by Endocrine Society, highlighting the diagnostic role of the late-night salivary cortisol (at least two samples in two different days), determined by an immunoassay with a proper cut-off, or a LC-MS/MS method.

The importance of standardizing the saliva collection is confirmed, coupled with an adequate device and detailed information for the patient.

We recommend against random serum cortisol and plasma ACTH samples, urinary 17-ketosteroids, insulin tolerance test, loperamide test, 8 mg dexametasone.

La sindrome di Cushing è un complesso di segni e sintomi determinato da un'esposizione cronica a elevati livelli di glucorticoidi circolanti di cui si distingue una forma esogena (iatrogena), e una forma endogena. La maggioranza dei casi di sindrome di Cushing ACTH-dipendenti è rappresentata dalla malattia di Cushing ovvero da tumori ipofisari che producono ACTH, mentre le forme di sindrome di Cushing ACTH-indipendenti sono riconducibili a tumori surrenalici, in prevalenza benigni, che producono cortisolo.

La presentazione clinica è, in genere, caratterizzata da obesità centrale, striae rubrae, acne, irsutismo, astenia muscolare e osteoporosi, disfunzioni gonadiche (nel maschio ipogonadismo ipogonadotropo, nella femmina cicli oligo- o anovulatori), ipertensione arteriosa, alterazioni metaboliche (diabete mellito e iperlipidemia), disturbi neuropsichiatrici (depressione e psicosi), anche se le forme subcliniche sono più frequenti di quelle conclamate e si riscontrano nel 5-20% dei casi di incidentaloma surrenalico.

La revisione della letteratura successiva alle linee guida dell'Endocrine Society ha confermato nel complesso le raccomandazioni del 2008: diagnostic odd ratio e number needed to diagnose dimostrano che il cortisolo libero urinario, il cortisolo salivare notturno e il cortisolo sierico totale dopo test al desametasone 1 mg overnight raggiungono valori molto soddisfacenti e comparabili. Le presenti raccomandazioni pratiche della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio riprendono quelle dell'Endocrine Society del 2008, privilegiando tuttavia il ruolo della raccolta di almeno due campioni di cortisolo salivare notturno, determinato con metodo immunometrico e attenta valutazione del relativo cut-off, o con metodo LC-MS/MS.

Si conferma l'importanza di standardizzare la fase della raccolta della saliva usando un dispositivo adeguato e istruzioni dettagliate per il paziente.

Si ribadisce di non eseguire per lo screening della sindrome di Cushing i seguenti test: cortisolo sierico e ACTH plasmatico, prelevati casualmente nel corso della giornata, 17-chetosteroidi urinari, test di tolleranza all'insulina, test alla loperamide e test al DST 8 mg.



Conflict of Interest Declaration Form

Il sottoscritto/a (La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio - Italian Journal of Laboratory Medicine) garantisce l'oggettività, l'indipendenza, l'imparzialità e l'equità scientifica del suo contributo. Non gli/le autori sono tenuti a escludere né riferire un conflitto reale o potenziale di interessi che possono essere un oggetto diretto o indiretto del loro articolo.

Questo riguarda i rapporti con le aziende farmaceutiche, i produttori di dispositivi biomedici e altri prodotti, i servizi finanziari, essere correlati all'argomento dell'articolo o alla specializzazione dello studio descritto.

Non vi viene assolutamente concesso la pubblicazione di articoli da parte di autori con un potenziale conflitto di interessi. L'impugnazione di questi autori rende il manoscritto automaticamente a latere. Gli autori non gli strumenti per gestire tramite un proprio (pubblico e privato) sito internet o sistemi di posta elettronica, o altri mezzi di comunicazione, o altri rapporti di corrispondenza con i colleghi e membri il comitato per l'Editor in Chief per conto di altri gli autori o autori di sottoposti.

It is the policy of La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio (Italian Journal of Laboratory Medicine) to ensure unbiased, independence, objectivity, and scientific rigor in the Journal. All authors are expected to disclose to the readers any real or potential conflicts of interest that may have a direct bearing on the subject matter of the article. This includes relationships with pharmaceutical companies, biomedical device manufacturers or other organizations whose products or services may be related to the subject matter of the article or who have sponsored the study.

The intent of the policy is not to prevent authors with a potential conflict of interest from publishing. It is merely intended that any potential conflict should be disclosed openly so that the readers may form their own judgments about the article with the full disclosure of the facts. It is for the readers to determine whether the authors' outside interests may reflect a possible bias in either the preparation of the conclusions presented.

The competing author and complete and signed form turn to the Editor in Chief on behalf of all authors listed below.

Il sottoscritto/a (La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio)

garantisce l'oggettività, l'indipendenza, l'imparzialità e l'equità scientifica del suo contributo. Non gli/le autori sono tenuti a escludere né riferire un conflitto reale o potenziale di interessi che possono essere un oggetto diretto o indiretto del loro articolo.

Questo riguarda i rapporti con le aziende farmaceutiche, i produttori di dispositivi biomedici e altri prodotti, i servizi finanziari, essere correlati all'argomento dell'articolo o alla specializzazione dello studio descritto.

Non vi viene assolutamente concesso la pubblicazione di articoli da parte di autori con un potenziale conflitto di interessi. L'impugnazione di questi autori rende il manoscritto automaticamente a latere. Gli autori non gli strumenti per gestire tramite un proprio (pubblico e privato) sito internet o sistemi di posta elettronica, o altri mezzi di comunicazione, o altri rapporti di corrispondenza con i colleghi e membri il comitato per l'Editor in Chief per conto di altri gli autori o autori di sottoposti.

Per competenza/competence in English (Inventor/Inventor's name)

If any conflict exists, please declare whether the author is present at an institution named "Nestlé", although disclosure of actual relationships is not required. The author is not required to disclose any potential conflict of interest that may be related to the subject matter of the article or who have sponsored the study.

The intent of the policy is not to prevent authors with a potential conflict of interest from publishing. It is merely intended that any potential conflict should be disclosed openly so that the readers may form their own judgments about the article with the full disclosure of the facts. It is for the readers to determine whether the authors' outside interests may reflect a possible bias in either the preparation of the conclusions presented.

The competing author and complete and signed form turn to the Editor in Chief on behalf of all authors listed below.

Il sottoscritto/a (La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio)

garantisce l'oggettività, l'indipendenza, l'imparzialità e l'equità scientifica del suo contributo. Non gli/le autori sono tenuti a escludere né riferire un conflitto reale o potenziale di interessi che possono essere un oggetto diretto o indiretto del loro articolo.

Questo riguarda i rapporti con le aziende farmaceutiche, i produttori di dispositivi biomedici e altri prodotti, i servizi finanziari, essere correlati all'argomento dell'articolo o alla specializzazione dello studio descritto.

Non vi viene assolutamente concesso la pubblicazione di articoli da parte di autori con un potenziale conflitto di interessi. L'impugnazione di questi autori rende il manoscritto automaticamente a latere. Gli autori non gli strumenti per gestire tramite un proprio (pubblico e privato) sito internet o sistemi di posta elettronica, o altri mezzi di comunicazione, o altri rapporti di corrispondenza con i colleghi e membri il comitato per l'Editor in Chief per conto di altri gli autori o autori di sottoposti.

The intent of the policy is not to prevent authors with a potential conflict of interest from publishing. It is merely intended that any potential conflict should be disclosed openly so that the readers may form their own judgments about the article with the full disclosure of the facts. It is for the readers to determine whether the authors' outside interests may reflect a possible bias in either the preparation of the conclusions presented.

The competing author and complete and signed form turn to the Editor in Chief on behalf of all authors listed below.

RASSEGNA

La diagnostica di laboratorio delle malattie del surrene.

Raccomandazioni pratiche per la sindrome di Cushing

Federica D’Aurizio • Renato Tozzoli • Romolo M Dorizzi • Vincenzo Brescia • Elisa Esposito • Antonio Fortunato • Luca Giovanella • Gabriele Guzzaloni • Gruppo di Studio Endocrinologia e Malattie del Metabolismo (GdS-EMM)

Ricevuto: / Accettato:

F. D’Aurizio, R. Tozzoli

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale S. Maria degli Angeli, AAS5, Pordenone, Italia

R. M. Dorizzi

UOC Core-Lab, AUSL della Romagna, Pievesestina di Cesena (FC), Italia

V. Brescia

UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Pia Fondazione di Culto e Religione Card. G. Panico, Tricase (LE), Italia

E. Esposito

Laboratorio di Patologia Clinica, ARNAS Civico e Benfratelli, Palermo, Italia

A. Fortunato

Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italia

L. Giovanella

Medicina Nucleare e Centro PET/CT, Istituto Oncologico della Svizzera Italiana, Bellinzona, Svizzera

G. Guzzaloni

Ospedale S. Giuseppe, IRCSS Istituto Auxologico Italiano, Verbania, Italia

F. D’Aurizio 

Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Maria degli Angeli, Azienda per l’Assistenza Sanitaria n. 5, “Friuli Occidentale”, Via Montereale 24, 33170 Pordenone, Italia

Tel. +39 0434 399213
Fax +39 0434 399906
E-mail: federica.daurizio@as5.sanita.fvg.it

Nota a piè pagina

Prosegue in questo numero una serie di contributi relativi alla Diagnostica di Laboratorio delle malattie del surrene a opera del Gruppo di Studio di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo (GdS-EMM) della SIPMeL.

Abbreviazioni

ACTH = *Adrenocorticotropic hormone*
CBG = *Cortisol binding globulin*
CLIA = *Chemiluminescence immunoassay*
CLU = Cortisolo libero urinario
CMIA = *Carbonil-metallo-immunoassay*
CSL = Cortisolo sierico libero
CSN = Cortisolo salivare notturno
CST = Cortisolo sierico totale
CSTN = Cortisolo sierico totale notturno
CVA = Coefficiente di variazione analitica
DC = Differenza critica
DOR = *Diagnostic odd ratio*
DST = Desametasone
ECLIA = *Electrochemiluminescence immunoassay*
EIA = *Enzyme immunoassay*
ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ES = *Endocrine Society*
GC-MS = *Gas chromatography-mass spectrometry*
HPLC = *High performance liquid chromatography*
ID-GC/MS = *Isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry*
II = Indice di individualità
LC-MS/MS = *Liquid chromatography-mass spectrometry*
NND = *Number needed to diagnose*

oDST = Test di soppressione al desametasone 1 mg *overnight*

RIA = *Radioimmunoassay*

ROC = *Receiver operating characteristic*

SC = *Sindrome di Cushing*

TR-FIA = *Time-resolved fluoroimmunoassay*

Riassunto La sindrome di Cushing è un complesso di segni e sintomi determinato da un'esposizione cronica a elevati livelli di glucorticoidi circolanti di cui si distinguono una forma esogena (iatrogena) e una forma endogena. La maggior parte dei casi di sindrome di Cushing ACTH-dipendenti è rappresentata dalla malattia di Cushing, ovvero da tumori ipofisari che producono ACTH, mentre le forme di sindrome di Cushing ACTH-indipendenti sono riconducibili a tumori surrenalici, in prevalenza benigni, che producono cortisolo. La presentazione clinica è, in genere, caratterizzata da obesità centrale, *striae rubrae*, acne, irsutismo, astenia muscolare e osteoporosi, disfunzioni gonadiche (nel maschio ipogonadismo ipogonadotropo, nella femmina cicli oligo- o anovulatori), ipertensione arteriosa, alterazioni metaboliche (diabete mellito e iperlipidemia), disturbi neuropsichiatrici (depressione e psicosi), anche se le forme subcliniche sono più frequenti di quelle conclamate e si riscontrano nel 5-20% dei casi di incidentaloma surrenalico. La revisione della letteratura successiva alle linee guida della *Endocrine Society* ha confermato nel complesso le raccomandazioni del 2008: *diagnostic odd ratio* e *number needed to diagnose* dimostrano che il cortisolo libero urinario, il cortisolo salivare notturno e il cortisolo sierico totale dopo test al desametasone 1 mg *overnight* raggiungono valori molto soddisfacenti e comparabili. Le presenti raccomandazioni pratiche della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio riprendono quelle della *Endocrine Society* del 2008, privilegiando tuttavia il ruolo della raccolta di almeno due campioni di cortisolo salivare notturno, determinato con metodo immunometrico e attenta valutazione del relativo *cut-off*, o con metodo LC-MS/MS. Si conferma l'importanza di standardizzare la fase della raccolta della saliva utilizzando un dispositivo adeguato e istruzioni dettagliate per il paziente. Si ribadisce di non eseguire per lo screening della sindrome di Cushing i seguenti test: cortisolo sierico e ACTH plasmatico, prelevati casualmente nel corso della giornata, 17-chetosteroidi urinari, test di tolleranza all'insulina, test alla loperamide e test al DST 8 mg.

Parole chiave Sindrome di Cushing • Cortisolo libero urinario • Cortisolo salivare notturno • Cortisolo sierico • Test di soppressione al desametasone

T1 Inquadramento clinico

La sindrome di Cushing è un complesso di segni e sintomi determinato da un'esposizione cronica a elevati livelli di glucorticoidi circolanti [1]. Si distinguono una forma esogena (iatrogena), dovuta a un'assunzione prolungata di cortisonici a dosaggio sovralfisiologico, e una forma endogena, più rara, con un'incidenza in Europa di 0,7-2,4 casi/1.000.000 abitanti/anno, dovuta a condizioni ACTH-dipendenti e ACTH-indipendenti (Tab. 1) [2, 3].

La maggior parte dei casi di sindrome di Cushing ACTH-dipendenti è rappresentata dalla malattia di Cushing ovvero da tumori ipofisari che producono ACTH, più frequenti nelle donne in età fertile; circa il 10% dei casi è dovuto alla secrezione ectopica di ACTH (tumori extra-pituitarici che producono ACTH o CRH). Le forme di sindrome di Cushing ACTH-indipendenti sono riconducibili a tumori surrenalici benigni (circa 60% dei casi) o maligni che producono cortisolo [4]. Il quadro clinico è, in genere, caratterizzato da obesità centrale, *striae rubrae*, acne, irsutismo, astenia muscolare e osteoporosi, disfunzioni gonadiche (nel maschio ipogonadismo ipogonadotropo, nella femmina cicli oligo- o anovulatori), ipertensione arteriosa, alterazioni metaboliche (diabete mellito e iperlipidemia), disturbi neuropsichiatrici (depressione e psicosi) (Tab. 2) [2, 3]. Esistono anche forme di sindrome di Cushing intermittenti, che presentano un andamento ciclico delle manifestazioni cliniche e biochimiche [5], e forme subcliniche, caratterizzate da un lieve aumento del cortisolo, senza segni e sintomi associati [6]. Le forme subcliniche sono più frequenti di quelle conclamate e si riscontrano nel 5-20% dei casi di incidentaloma surrenalico [7]. Per questi pazienti è importante una corretta diagnosi precoce perché l'ipercortisolismo, anche se lieve, contribuisce all'insorgenza di insulino-resistenza, obesità, ipertensione e osteoporosi [8, 9]. Dal momento che la sindrome di Cushing si sovrappone clinicamente a condizioni di pseudo-Cushing, quali alcolismo, stati depressivi, diabete controllato in modo inadeguato, obesità patologica e sindrome dell'ovaio policistico [4], assume particolare rilievo uno screening efficace [2, 5].

T1 Diagnosi di laboratorio

La *Endocrine Society* ha aggiornato nel 2008, con la partecipazione della *European Society of Endocrinology*, le linee guida per la diagnosi di sindrome di Cushing [10, 11]. Il primo test da eseguire deve possedere un'accuratezza diagnostica elevata e la *Endocrine Society* raccomanda uno dei seguenti esami:

- cortisolo libero urinario (CLU) [almeno 2 raccolte];
- cortisolo salivare notturno (CSN) [2 prelievi in 2 giorni diversi];
- cortisolo sierico totale (CST) dopo test di soppressione al desametasone (DST), 1 mg *overnight* (oDST) o 2 mg/die per 48 ore.

La *Endocrine Society* raccomanda, inoltre, di non eseguire più i seguenti esami per porre diagnosi di sindrome di Cushing:

- cortisolo sierico o ACTH plasmatico, prelevati in orario casuale;
- 17-chetosteroidi urinari;
- test di tolleranza all'insulina;
- test alla loperamide;
- test al DST 8 mg.

I tre esami di screening raccomandati indagano i tre aspetti principali della fisiopatologia della sindrome di Cushing ovvero l'aumentata produzione di cortisolo, valutata misurando il CLU, la perdita del ritmo circadiano del cortisolo con mancato raggiungimento del *nadir* serale, documentata dal CSN, e la diminuita sensibilità al *feed-back* negativo esercitato dai glucocorticoidi presenti in eccesso, verificata con l'oDST [12].

La determinazione del cortisolo in siero, urina e saliva riveste, quindi, importanza fondamentale nella diagnostica delle patologie surrenaliche ed è necessario conoscerne caratteristiche e limiti. Le criticità nella determinazione del cortisolo riguardano le fasi preanalitica (liquido biologico impiegato e modalità di raccolta), analitica (metodi di misura e performance analitiche) e postanalitica (performance diagnostiche, intervalli di riferimento, *cut-off*).

T2 Il cortisolo libero urinario

La determinazione del CLU ha rappresentato per molti anni il metodo di riferimento per valutare una sospetta sindrome di Cushing [12]. Il CLU riflette la forma biologicamente attiva dell'ormone, è indipendente dalle proteine di trasporto e costituisce un indice della secrezione di cortisolo nelle 24 ore; inoltre, la raccolta delle urine può essere eseguita dal paziente anche in ambiente domestico [13]. Tuttavia, la determinazione del CLU, che dipende dalla correttezza delle istruzioni date al paziente e dal grado di adesione alle istruzioni (evitare di bere quantità notevoli di liquidi e di utilizzare creme o unguenti contenenti steroidi; iniziare la raccolta con le seconde urine del mattino,

dopo aver scartato le prime; proseguire per l'intera giornata fino alle prime urine del mattino successivo; conservare il contenitore in un luogo fresco) [13], può essere ostacolata dalla complessa fase preanalitica e dalla non sempre adeguata raccolta del campione. Quando la durata della raccolta supera le 24 ore e il volume di liquidi assunti supera i 5 litri si possono avere risultati falsi positivi [12, 13]. Per ovviare, almeno in parte, al rischio di una raccolta delle urine non corretta, è consigliabile misurare anche la creatinina urinaria e quindi calcolare il rapporto cortisolemia/creatininuria [12-14].

Il CLU può essere determinato con metodi cromatografici (HPLC, GC-MS, LC-MS/MS), immunometrici competitivi senza estrazione, immunometrici competitivi con estrazione in fase liquida o solida, manuali (RIA, EIA) o automatizzati (CLIA) (Tab. 3) [14-21]. I metodi cromatografici, in particolare quelli in fase liquida, sono i più accurati perché in grado di separare e quantificare il cortisolo in presenza di altri steroidi anche di origine sintetica [22-27]. Si tratta di metodi complessi che richiedono strumentazione dedicata e personale adeguatamente addestrato; finora sono stati pertanto utilizzati prevalentemente in ambito di ricerca [27]. Negli ultimi anni si sta comunque verificando la loro progressiva, anche se lenta, introduzione nei Laboratori di patologia clinica, per rispondere alla crescente necessità di migliorare l'accuratezza nella diagnosi dell'ipercortisolismo e di altre patologie che richiedono la misura degli ormoni steroidei per la diagnosi e/o il follow-up [28, 29]. I metodi più diffusi per la determinazione del CLU sono i metodi immunometrici automatizzati in chemiluminescenza, economici, rapidi e di semplice utilizzo [13]: recentemente Raff et al hanno addirittura sostenuto la loro superiorità nelle prestazioni diagnostiche rispetto ai metodi separativi [30, 31].

Anche se la misura del CLU non è influenzata da farmaci o da condizioni che alterano la concentrazione delle proteine di trasporto dell'ormone circolante, i limiti dei metodi immunometrici sono numerosi [32]. Il principale problema è rappresentato dalla reattività crociata dell'anticorpo con molecole strutturalmente simili al cortisolo, come metaboliti del cortisolo stesso o steroidi sintetici che possono essere presenti nelle urine, anche a concentrazioni elevate (Tab. 4) [33]. Infatti, l'anticorpo utilizzato in molti dei metodi immunometrici riconosce il gruppo chetonico presente sul carbonio 3, caratteristico del cortisolo, ma anche di molti altri steroidi [34]. Anche se procedure di estrazione con solventi organici (come etilacetato e diclorometano) possono ridurre significativamente le interferenze, il trattamento del campione, oltre a essere complesso e richiedere molto tempo, elimina solo la frazione idrosolubile delle specie interferenti, lasciando nella fase organica molte sostanze contenenti il gruppo chetonico responsabile del legame con l'anticorpo e, quindi, della reattività crociata [35]. Per ridurre il tempo di risposta, da alcuni anni sono in uso metodi immunometrici automatizzati in chemiluminescenza senza estrazione, con cui si ottengono

valori di concentrazione di CLU più alti rispetto ai metodi con estrazione o in cromatografia, per la presenza di sostanze interferenti (Tab. 3) [36, 37]. Come rimedio a tale situazione alcuni autori hanno proposto una denominazione diversa (Corticoidi Liberi Urinari) e l'adozione di intervalli di riferimento idonei [13]. L'utilizzo da parte dei metodi immunometrici attualmente in commercio della calibrazione in matrice sierica anche per la determinazione del CLU costituisce un ulteriore limite, in quanto le due matrici naturali (siero e urine) presentano caratteristiche diverse (i metaboliti del cortisolo, per esempio, sono molto più numerosi nella matrice urinaria) [34]. Secondo la letteratura, gli intervalli di riferimento presentano una notevole variabilità metodo- e sesso-dipendente [14-20]. Deutschbein et al [14] hanno studiato la variabilità intra-individuale del CLU, ottenendo un coefficiente di variazione medio del 41-46%, paragonabile a quello rilevato recentemente da Petersenn et al in un'ampia coorte di pazienti con sindrome di Cushing (52%) [21]. Le raccomandazioni della *Endocrine Society* di eseguire almeno 2 raccolte delle urine nelle 24 ore per la misura del CLU [10] trovano pertanto conferma, ma sia Elias et al [19] sia Petersenn et al [21] suggeriscono 3, o addirittura 4 campioni, per una stima ancora più precisa del CLU.

T2 Il cortisolo salivare notturno

Le linee guida per la diagnosi della sindrome di Cushing indicano il CSN tra i possibili esami per lo screening della sindrome di Cushing [10]. Il cortisolo sierico libero (CSL) è in equilibrio con il cortisolo salivare, che non è influenzato né dalla velocità di produzione della saliva in un dato momento né dalle proteine di trasporto, la cui concentrazione varia in diverse condizioni patologiche o in seguito all'assunzione di farmaci. È stata dimostrata una forte correlazione tra il CSN e il CSL, con un andamento quasi sincrono dei profili di concentrazione dell'ormone nel siero e nella saliva [38]. Si è osservato, infatti, che la concentrazione del cortisolo nella saliva sale pochi minuti dopo l'aumento della concentrazione del cortisolo nel sangue.

La determinazione del cortisolo nella saliva presenta vantaggi rispetto a quella nel siero e nelle urine, in quanto la procedura di raccolta della saliva è semplice, non invasiva e attuabile agevolmente in ambiente domestico, senza necessità di supporto da parte di personale qualificato o di variazioni delle attività quotidiane consuete.

Esistono molti aspetti delle modalità per la raccolta della saliva di cui si deve tenere conto perché in grado di influenzare l'accuratezza diagnostica dell'esame [39-41]; possono essere utilizzati contenitori sterili in cui si raccoglie direttamente la saliva o materiali assorbenti (tamponi di poliestere, polietilene o cotone) che sono trasferiti in apposite provette. I sistemi costituiti da tampone e provetta apposita di raccolta sono sicuramente i più diffusi per la semplicità di utilizzo e per la maneggevolezza del campione che, dopo la raccolta, può essere conservato a temperatura

ambiente anche per 1 settimana, prima della consegna al Laboratorio. I dispositivi con tampone forniscono, inoltre, un campione più pulito e meno viscoso rispetto alla saliva raccolta in un semplice contenitore sterile, in quanto il tampone svolge la funzione di filtro per le cellule di sfaldamento del cavo orale e per altre possibili impurità.

I due principali errori della fase preanalitica riportati in letteratura sono il mancato rispetto dell'orario della raccolta e la contaminazione del campione di saliva per il contatto con mani non pulite, rossetto per labbra e, all'interno del cavo orale, residui alimentari o creme a base di idrocortisone (nome, più formale, del cortisolo) [42]. Per ridurre le variabili preanalitiche è indispensabile fornire istruzioni dettagliate per la raccolta del campione: masticare il tampone per 1-3 minuti e, senza toccarlo con le mani, trasferirlo nella provetta dedicata. Il soggetto non deve lavarsi i denti, mangiare e bere (può assumere solo acqua) per almeno un'ora prima della raccolta del campione, anche se in letteratura questo intervallo è variabile da 15 a 180 minuti [19, 43]. Si raccomanda, inoltre, di evitare, nelle 2 ore che precedono la raccolta, esercizio fisico intenso e attività stressanti che possono aumentare la produzione di cortisolo [44]. Si consiglia anche di evitare, preferibilmente per l'intera giornata, il fumo e il consumo di liquirizia, che possono dare falsi positivi per aumento della concentrazione del cortisolo salivare [43].

Sebbene sia semplice e non invasiva, la raccolta della saliva presenta dei limiti in alcuni soggetti: pazienti con scarsa salivazione (come in presenza di sindrome di Sjögren e di disidratazione), soggetti poco collaboranti, neonati e bambini di età inferiore ai 3 anni [37, 45], pazienti con gengiviti e altre lesioni orali sanguinanti che possono causare livelli falsamente elevati di cortisolo salivare [46, 47]. Considerato, infatti, che il rapporto tra cortisolo salivare e cortisolo sierico è di circa 1:20, la contaminazione della saliva con il sangue può aumentare in modo spurio la concentrazione del cortisolo; tuttavia, in genere, è sufficiente l'ispezione visiva per valutare l'idoneità o meno del campione [13]. Si può riservare a casi particolari la dimostrazione dell'eventuale contaminazione con sangue utilizzando, per esempio, la ricerca della transferrina nella saliva [48].

Il CSN può essere determinato con metodi immunometrici manuali (RIA, EIA, ELISA) o automatizzati (ECLIA, TR-FIA) o con metodi cromatografici (GC-MS, LC-MS/MS), con performance analitiche e diagnostiche diverse (Tabb. 5, 6, 7 e 8) [7, 15-19, 42, 49-71]. I metodi cromatografici, in particolare l'LC-MS/MS, sono più specifici e sensibili, ma sono stati utilizzati finora prevalentemente nell'ambito della ricerca per la necessità di strumentazione dedicata e personale adeguatamente formato [72]. I metodi immunometrici in commercio sono di tipo competitivo, con un anticorpo primario che riconosce una forma coniugata di cortisolo [42]. Sono i più diffusi nei Laboratori di routine, in quanto richiedono un piccolo volume di saliva, sono di

facile e rapida esecuzione e hanno costi contenuti (Tab. 5). Presentano, tuttavia, dei limiti di sensibilità, in quanto le concentrazioni del CSN sono prossime alla sensibilità funzionale di gran parte dei metodi utilizzati, e di specificità, per possibile *cross*-reazione con altri steroidi salivari. A riguardo, Jönsson et al hanno valutato con l'LC-MS/MS le interferenze di 5 α -diidrocortisolo, 21-desossicortisolo, prednisolone, 5 β -diidrocortisolo e 6 α -metilprednisolone con l'anticorpo di un metodo RIA per la misura del CSN, dimostrando una *cross*-reattività di 84,3%, 78,8%, 45,3%, 11,9% e 11,0%, rispettivamente [73]. Inoltre, la *cross*-reattività tra corticosterone e cortisone era dello 0,2%. Nel complesso, i valori di concentrazione del CSN con metodo immunologico erano più alti di 2,7 volte rispetto ai valori determinati in LC-MS/MS [73]. Quindi, sebbene vi sia correlazione tra i metodi utilizzati per la misura del CSN, gli studi pubblicati in letteratura descrivono una considerevole discrepanza tra i valori assoluti ottenuti con i diversi metodi e conseguentemente una notevole variabilità degli intervalli di riferimento e del *cut-off* suggerito per porre diagnosi di sindrome di Cushing (da 2,1 a 15,2 nmol/L) (Tabb. 6, 7 e 8) [49-69]. Parte di questa variabilità è riconducibile, oltre che alla modalità di raccolta della saliva e al metodo utilizzato, all'assenza di armonizzazione per la mancanza di materiale certificato e di programmi di valutazione esterna di qualità (che consentono di documentare almeno la diversità dei vari metodi) [73]. Un ruolo rilevante è svolto anche dal numero di soggetti arruolati negli studi, dai criteri di arruolamento (pazienti con sindrome di Cushing conclamata, con sindrome di Cushing subclinica, soggetti con pseudo-Cushing, volontari sani) e dalla modalità di analisi dei dati; per esempio, alcuni autori hanno ricavato il *cut-off* dalla curva ROC, mentre altri si sono limitati a calcolare l'*upper reference limit* dai controlli sani (Tabb. 6, 7 e 8) [74, 75].

Secondo le linee guide della *Endocrine Society*, il CSN non consente di discriminare i pazienti con ipercortisolismo subclinico dai controlli e il test di screening da privilegiare in questo contesto è l'oDST, utilizzando come *cut-off* il valore tradizionale di 140 nmol/L (50 μ g/L) piuttosto che quello raccomandato oggi più frequentemente di 50 nmol/L (18 μ g/L) [10]. Più recentemente, altri autori hanno invece sostenuto che un altro vantaggio del CSN risiede proprio nella capacità di identificare pazienti con ipercortisolismo subclinico e ciclico [31, 76].

Nonostante l'importante variabilità analitica descritta, revisioni recenti della letteratura riportano performance diagnostiche degli esami immunometrici soddisfacenti con una sensibilità e una specificità superiori al 90% (Tabb. 6, 7 e 8) [74-79]. Inaspettatamente, la performance diagnostica dell'LC-MS/MS non è migliore di quella dei metodi immunometrici (Tab. 8). Secondo Raff et al, la *cross*-reattività dei metodi immunometrici con altri metaboliti del cortisolo potrebbe costituire un vantaggio per porre diagnosi di sindrome di Cushing [30, 31]. L'LC-MS/MS è, invece,

estremamente utile per valutare l'eventuale contaminazione della saliva con idrocortisone e altri steroidi sintetici [42].

Secondo le linee guida della *Endocrine Society* [10] e altri autori [19, 55] in considerazione delle fluttuazioni della secrezione del cortisolo, 2 raccolte per CSN in 2 giorni diversi aumentano la sicurezza del risultato ottenuto. La letteratura sull'argomento arriva a conclusioni molto disomogenee. In uno studio pilota, condotto da Chiu et al [80], il cortisolo salivare del mattino, misurato con un metodo ECLIA automatizzato, in 5 campioni raccolti in 28 volontari sani nell'arco di 2 settimane, presentava un coefficiente di variazione analitica (CVA) di 3,8%, un indice di individualità (II) inferiore a 0,6% (0,36%) e una differenza critica (DC) di 20,4%, facendo concludere agli autori che la DC era da preferire a un intervallo di riferimento ottenuto nella popolazione. Casals et al [81] hanno valutato la variabilità biologica del CSN in volontari sani misurando, con metodo ELISA su micropiastra, 2 campioni a settimana per 4 settimane (8 misure in 7 pazienti, studio A) e di 2 campioni di 20 volontari sani in 2 serie successive (studio B). I risultati ottenuti dai 2 studi erano paragonabili; in particolare, gli II erano 1,06 nello studio A e 0,93 nello studio B con una DC del 100% circa (103,6% nello studio A e 98,6% nello studio B). Sulla base dei risultati ottenuti ($II > 0,6$), gli autori hanno concluso che variazioni rilevanti del CSN possono essere identificate sia con gli intervalli di riferimento convenzionali sia con la differenza dei valori di CSN ottenuta da prelievi seriati (considerando significative variazioni superiori al 104%) [81]. Anche i dati raccolti in modo meno sistematico da altri autori, quali Cardoso et al [54], Carrasco et al [64], Bukan et al [67] e Brescia et al [82], confermano che la questione non è ancora risolta in modo unanime.

T2 *Cortisolo sierico dopo test di soppressione al desametasone*

Anche la determinazione del CST ha un ruolo nella valutazione diagnostica dei disordini del corticosurrene [37]. Il CST è legato per circa il 90% alla transcortina o CBG, una proteina di 50 kDa appartenente alla famiglia delle serpine (inibitori delle serin-proteasi) e per circa il 5% all'albumina. La forma libera rappresenta, quindi, solo il 2-5% del totale. Le concentrazioni della CBG sono influenzate da farmaci, ormoni, condizioni patologiche come la sepsi e parafisiologiche come la gravidanza. Di tali cause di variazioni di concentrazione si deve tenere conto quando si misura il CST [10, 83].

I metodi di dosaggio del CST hanno subito un'evoluzione negli ultimi 20 anni. Partendo dal CMIA [84] si è arrivati a metodi cromatografici (HPLC, GC-MS, LC-MS) [85, 86], passando per metodi immunometrici competitivi con e senza estrazione, manuali (RIA, EIA) e automatizzati (CLIA) [13]. Questi ultimi hanno i vantaggi della semplicità, della buona qualità analitica e della variabilità analitica, intra- e inter-metodo, contenuta; presentano, tuttavia, delle criticità analitiche dovute

principalmente all'inibizione del legame con le proteine vettrici, alla matrice dei calibratori utilizzati con possibili interferenze nel dosaggio e alla presenza nel siero di altri steroidi (per esempio, prednisolone e 11-desossicortisolo) con frequenti reazioni di *cross*-reattività [32]. La riduzione del fenomeno della *cross*-reattività con conseguente miglioramento della specificità analitica richiede metodi più complessi, costosi e *time-consuming* che prevedono una purificazione del campione. Roberts e Roberts, confrontando le performance analitiche di 5 metodi immunometrici automatizzati per la misura del CST (Access™, Advia Centaur™, AxSYM™, Elecsys 2010™ e Immulite 2000™), hanno dimostrato una buona linearità e un'impresione totale inferiore al 10% nelle 3 concentrazioni esaminate (bassa, intermedia e alta), per tutti i metodi, con qualche eccezione a basse concentrazioni. Gli autori hanno tuttavia rilevato una notevole variabilità dei risultati metodo-dipendente, che confermava la necessità di standardizzazione con un metodo di riferimento cromatografico, come ID-GC/MS o LC-MS/MS [87]. I metodi cromatografici, infatti, garantiscono per il cortisolo sierico migliori performance di sensibilità analitica rispetto ai metodi immunometrici [17, 59, 86].

La valutazione del CST non è appropriata in condizioni cliniche particolarmente gravi caratterizzate da una diminuzione significativa delle concentrazioni delle proteine plasmatiche e quindi anche della frazione proteica che lega il cortisolo [88]. In questi casi, il CSL è un indicatore più affidabile della funzionalità surrenalica. Tuttavia, i metodi di ultrafiltrazione, dialisi all'equilibrio o gel filtrazione per la misura del CSL non sono adatti alla routine dei Laboratori in quanto molto complessi, di difficile standardizzazione e costosi. Per questo motivo, usualmente, il CSL viene calcolato conoscendo la concentrazione del CST e la capacità di legame della CBG, oppure la concentrazione del CST e della CBG utilizzando l'equazione di Coolens [88, 89].

Anche se la misura del cortisolo sierico totale notturno (CSTN) [ore 23:00-24:00] è tradizionalmente accettata come test di screening per la sindrome di Cushing [10], in letteratura è riportato un ampio intervallo di *cut-off*. Questa variabilità dipende, oltre che dai metodi utilizzati, dalle diverse modalità del prelievo (durante il sonno o dopo diversi minuti dal risveglio) e dal tipo di soggetti arruolati nel campione di controllo (sani, obesi, con pseudo-Cushing) [37]. Reimondo et al [90] hanno confrontato mediante curva ROC il *cut-off* di CSTN (229 nmol/L, 83 µg/L), CLU (657 nmol/24 ore, 238 µg/24 ore) e CST dopo oDST (110 nmol/L, 40 µg/L), per porre diagnosi di sindrome di Cushing, dimostrando che il CSTN presentava la migliore performance diagnostica con una sensibilità del 91,8% e una specificità del 96,4%. Nonostante questo, a causa della difficoltà pratica di eseguire il prelievo durante la notte in soggetti non ospedalizzati, la determinazione del CSTN è stata in gran parte sostituita da altri esami, quali CSN e oDST, che presentano maggiore praticità di esecuzione.

L'odST, noto anche come test di Nugent, prevede la somministrazione per os di 1 mg di DST tra le ore 23:00 e le ore 24:00 e la misura del CST al mattino successivo tra le ore 8:00 e le ore 9:00. Nei pazienti con sindrome di Cushing, a differenza di quanto accade nei soggetti sani, l'assunzione di basse dosi di glucocorticoidi sintetici non determina la soppressione dei livelli di ACTH e cortisolo per ridotta sensibilità al *feed-back* negativo. Il *cut-off* di CST dopo odST è ancora oggetto di discussione e varia da 50 nmol/L (18 µg/L) a 140 nmol/L (50 µg/L). Il valore di 50 nmol/L, proposto recentemente da Cardoso et al [54] e sostenuto anche da Guignat e Bertherat [11], aumenta la sensibilità a scapito della specificità (Tab. 9). Il test di soppressione con DST 2 mg al giorno per 48 ore è riservato ai pazienti in cui condizioni psichiatriche (come depressione, ansia e disordini ossessivi-compulsivi), obesità grave e alcolismo possono determinare un'iperattivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, senza però presentare una vera sindrome di Cushing [10]. Anche se gli studi pubblicati sulla determinazione del cortisolo salivare dopo odST sono ancora pochi, secondo Deutschbein et al [65] la misura nella saliva presenta un'accuratezza diagnostica paragonabile a quella eseguita nel siero, rendendo l'esame più pratico per il paziente e superando le problematiche analitiche associate alla misura del CST (Tab. 9) [91]. L'odST deve essere evitato in gravidanza e nei pazienti che assumono farmaci che accelerano (per esempio, fenobarbital, fenitoina, carbamazepina) o rallentano (per esempio, ritonavir, fluoxetina, cimetidina) il metabolismo del DST, rispettivamente inducendo o inibendo il citocromo CYP 3A4 [12].

T2 Quale test utilizzare?

Secondo le linee guida della *Endocrine Society*, CLU, CSN e CST dopo odST hanno performance diagnostiche elevate e paragonabili per la diagnosi di sindrome di Cushing [10, 92]. Inoltre, numerosi autori hanno dimostrato che CSTN, CSN, CST dopo odST e cortisolo salivare del mattino dopo odST sono ben correlati sia nel gruppo dei pazienti sia in quello dei controlli [7, 54, 55, 65]. La correlazione tra CSN e CLU è stata invece descritta solo nel gruppo dei pazienti con sindrome di Cushing, ma non nei controlli; questo riflette probabilmente la cinetica di legame del cortisolo sierico alla CBG, pertanto si verifica un aumento significativo del CLU solo quando elevate concentrazioni di cortisolo sierico hanno saturato i siti di legame della CBG [19, 50, 51]. Nonostante le elevate performance diagnostiche dei 3 test di screening suggeriti dalla *Endocrine Society* [10], alcuni autori hanno proposto di utilizzare più test contemporaneamente allo scopo di aumentare ulteriormente l'accuratezza diagnostica [1, 12], sostenendo l'utilità di questo approccio per la diagnosi delle forme subcliniche e cicliche di sindrome di Cushing. In questi casi, infatti, la singola determinazione di CSN o di CLU presenta una bassa accuratezza diagnostica, mentre più determinazioni successive di CSN o di CLU e, meglio ancora, la combinazione di CSN o di CLU

con il CST dopo oDST aumentano in modo considerevole sensibilità e specificità diagnostiche [6, 63, 66, 93].

La letteratura successiva alle linee guida della *Endocrine Society* ha confermato, nel complesso, le raccomandazioni del 2008: le Tabelle 3, 6, 7, 8 e 9 dimostrano che CLU, CSN e CST dopo oDST raggiungono valori di DOR e di NND molto soddisfacenti e comparabili. Le Tabelle riportano anche l'indicazione del produttore dei metodi citati in letteratura per la determinazione del cortisolo nelle urine e nella saliva. Tuttavia, l'utilità pratica di molti articoli è scarsa, dal momento che si basano su metodiche che, con l'eccezione della metodica ECLIA, non sono più commercializzate da molti anni e per le quali non esiste alcuna informazione circa la confrontabilità con i metodi oggi in uso.

La nostra opinione è privilegiare il CSN come esame di screening iniziale per la sindrome di Cushing, considerati le ottime prestazioni diagnostiche, la facilità della raccolta del campione, la possibilità di automazione con elevata riproducibilità e i costi contenuti [18, 92, 94]. Il CLU dovrebbe essere sempre misurato con metodi separativi o, in alternativa, immunometrici con estrazione e il CST dopo oDST con metodi separativi o immunometrici di adeguata sensibilità.

Nella Figura 1 è indicato l'algoritmo proposto per la diagnosi di sindrome di Cushing che riprende, integrato e modificato, quanto suggerito da Raff [42]. Nel sospetto clinico di sindrome di Cushing, l'esame da preferire è il CSN (almeno 2 prelievi in 2 giorni diversi) con metodo immunometrico o, laddove disponibile, con LC-MS/MS.

Se entrambi i campioni hanno concentrazioni inferiori al *cut-off*, si esclude la diagnosi di sindrome di Cushing con una confidenza del 90-95%. Nel caso in cui i risultati dei 2 campioni siano tra loro discordanti o solo lievemente superiori al *cut-off*, si può valutare se ripetere il test (2 prelievi), assicurandosi che vengano seguite scrupolosamente le istruzioni per la raccolta, oppure ricorrere al CLU o all'oDST.

Se uno o entrambi i risultati sono superiori al *cut-off* di almeno 20 volte, nel sospetto di una contaminazione del campione di saliva (falsi positivi per errore preanalitico), è consigliabile determinare con l'LC-MS/MS le concentrazioni di cortisone e cortisolo salivari. Se la concentrazione del primo è superiore a quella del secondo, l'ipercortisolismo endogeno è molto probabile e andrebbe confermato con un ulteriore test (CLU o oDST). Se, invece, si verifica la situazione opposta (cortisolo più elevato), va sospettata una contaminazione con idrocortisone topico. Esiste anche la possibilità che il soggetto abbia un deficit di 11 β -idrossi-steroido-deidrogenasi di tipo 2, con conseguente ridotta o assente conversione di cortisolo in cortisone a livello di ghiandole salivari. Se la concentrazione di cortisolo salivare ottenuta in LC-MS/MS è

molto più bassa di quella determinata con metodo immunometrico, si deve sospettare una contaminazione da steroidi sintetici.

Infine, se entrambi i campioni di saliva presentano concentrazioni elevate di CSN (compresi tra 2 e 20 volte il *cut-off*), si pone diagnosi di sindrome di Cushing con una confidenza del 90-95%. Anche in quest'ultimo caso, comunque, considerando le rilevanti conseguenze di una diagnosi differenziale non corretta tra sindrome di Cushing e condizioni di pseudo-Cushing, l'ipercortisolismo endogeno dovrebbe essere confermato con un ulteriore test (CLU o oDST).

T1 Raccomandazioni pratiche per la diagnosi di sindrome di Cushing.

La dimostrazione di una condizione cronica di ipercortisolismo rappresenta l'elemento fondamentale per porre diagnosi di sindrome di Cushing.

Utilizzando il sistema GRADE, le raccomandazioni sono state categorizzate in base alla forza (grado 1 e 2) e alla qualità delle prove secondo i livelli H (⊕⊕⊕⊕), M (⊕⊕⊕○), L (⊕⊕○○) e VL (⊕○○○) [95, 96].

Raccomandazione 1. Per lo screening della sindrome di Cushing si raccomanda di utilizzare il CSN (almeno 2 campioni in 2 giorni diversi) (1/⊕⊕⊕○).

Raccomandazione 2. Per la misura del CSN si suggerisce l'utilizzo di un metodo immunometrico, valutando attentamente il relativo *cut-off*, o di un metodo LC-MS/MS, che consente di identificare l'eventuale contaminazione da steroidi sintetici determinando i livelli sia di cortisolo sia di cortisone salivari (2/⊕⊕○○).

Raccomandazione 3. Per una corretta misura del CSN, si raccomanda di standardizzare la fase della raccolta della saliva utilizzando un dispositivo adeguato e istruzioni dettagliate per il paziente (1/⊕⊕⊕○).

Raccomandazione 4. Per lo screening della sindrome di Cushing si raccomanda di non eseguire i seguenti test: cortisolo sierico o ACTH plasmatico, prelevati casualmente nel corso della giornata, 17-chetosteroidi urinari, test di tolleranza all'insulina, test alla loperamide e test al DST 8 mg (1/⊕⊕⊕○).

Raccomandazione 5. Nel caso di discordanza dei risultati dei due campioni di CSN o di valori aumentati meno di 2 volte il *cut-off*, e per la conferma della diagnosi di sindrome di Cushing, si raccomanda l'utilizzo del CLU o dell'oDST (1/⊕⊕⊕○).

Raccomandazione 6. Per la misura del CLU, si suggerisce l'impiego di metodi cromatografici o, in alternativa, immunometrici con estrazione, calcolando il relativo *cut-off*, e la determinazione del rapporto cortisoloria/creatininuria (2/⊕⊕○○).

Raccomandazione 7. Per una corretta misura del CLU, si raccomanda di fornire al paziente istruzioni scritte e verbali dettagliate sulla modalità di raccolta delle urine delle 24 ore (1/⊕⊕⊕○).

Raccomandazione 8. Per la misura del CST dopo oDST si suggerisce l'utilizzo di metodi cromatografici o immunometrici di adeguata sensibilità (2/⊕⊕○○).

Raccomandazione 9. Per l'oDST, si raccomanda di somministrare per os 1 mg di DST tra le ore 23:00 e le ore 24:00 e di misurare il CST al mattino successivo tra le ore 8:00 e le ore 9:00. Il test di soppressione al DST 2 mg/die per 48 ore va riservato a condizioni cliniche particolari (1/⊕⊕⊕○).

Ringraziamenti

Si ringraziano i seguenti componenti del Gruppo di Studio di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo per la collaborazione prestata nella revisione critica del manoscritto: Erennio Ciotoli (Campobasso), Germana Giannone (Roma), Elisabetta Stenner (Trieste), Emanuela Toffalori (Trento), Marina Vitillo (Roma).

Conflitto di interesse Nessuno

Bibliografia

1. Deutschbein T, Petersenn S (2013) Screening for Cushing's syndrome: new immunoassays require adequate normative data. *Horm Metab Res* 45:118-123
2. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB et al (2006) Cushing's syndrome. *Lancet* 367:1605-1617
3. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB et al (2003) Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5593-5602
4. Pivonello R, De Martino MC, De Leo M et al (2008) Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37:135-149
5. Alexandraki KI, Grossman AB (2010) Novel insights in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology* 92(Suppl 1):35-43
6. Palmieri S, Morelli V, Polledri E et al (2013) The role of salivary cortisol measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of subclinical hypercortisolism. *Eur J Endocrinol* 168:289-296
7. Nunes ML, Vattaut S, Corcuff JB et al (2009) Late-night salivary cortisol for diagnosis of overt and subclinical Cushing's syndrome in hospitalized and ambulatory patients. *J Clin Endocrinol Metab* 94:456-462
8. Chiodini I, Torlontano M, Scillitani A et al (2005) Association of subclinical hypercortisolism with type 2 diabetes mellitus: a case-control study in hospitalized patients. *Eur J Endocrinol* 153:837-844

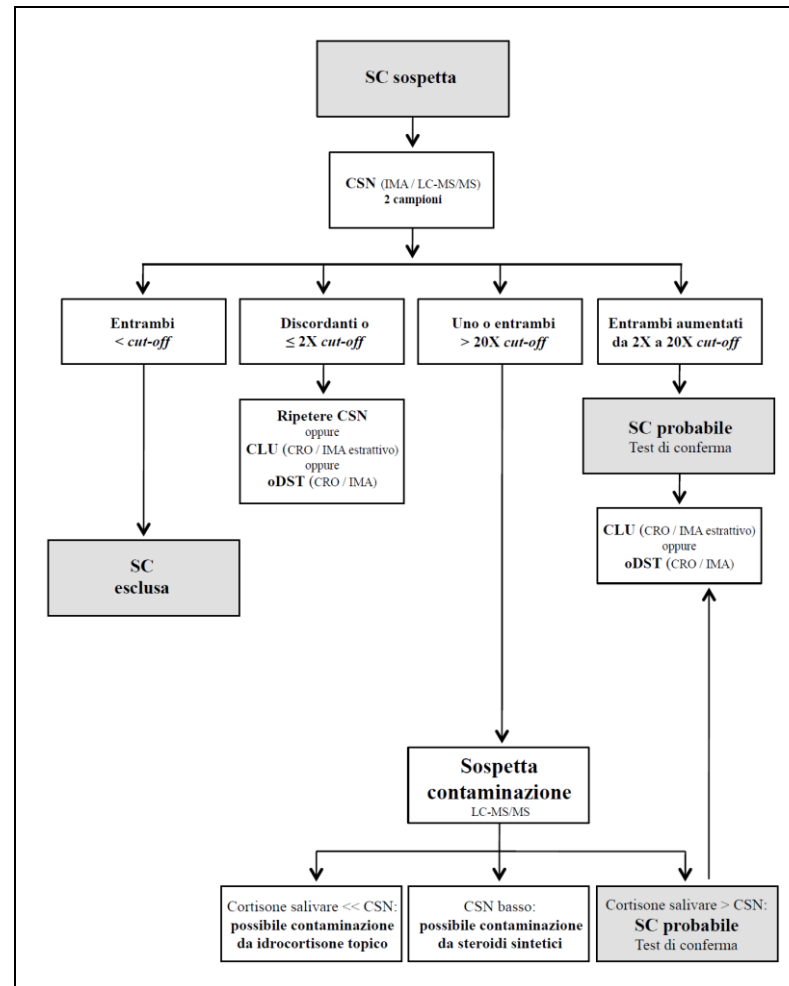
9. Terzolo M, Bovio S, Reimondo G et al (2005) Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 34:423-439
10. Nieman LK, Biller BM, Findling JW et al (2008) The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1526-1540
11. Guignat L, Bertherat J (2010) The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline: commentary from a European perspective. *Eur J Endocrinol* 163:9-13
12. Raff H, Sharma ST, Nieman LK (2014) Physiological basis for the etiology, diagnosis, and treatment of adrenal disorders: Cushing's syndrome, adrenal insufficiency, and congenital adrenal hyperplasia. *Compr Physiol* 4:739-769
13. Dorizzi R, Maltoni P (2010) Ruolo del Laboratorio nello studio della patologia surrenalica: logiche di intervento e strumenti di intervento. *Riv Ital Med Lab* 6:237-247
14. Deutschbein T, Broecker-Preuss M, Hartmann MF et al (2011) Measurement of urinary free cortisol by current immunoassays: need for sex-dependent reference ranges to define hypercortisolism. *Horm Metab Res* 43:714-719
15. Papanicolaou DA, Mullen N, Kyrou I et al (2002) Nighttime salivary cortisol: a useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4515-4521
16. Putignano P, Toja P, Dubini A et al (2003) Midnight salivary cortisol versus urinary free and midnight serum cortisol as screening tests for Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4153-4157
17. Manetti L, Rossi G, Grasso L et al (2013) Usefulness of salivary cortisol in the diagnosis of hypercortisolism: comparison with serum and urinary cortisol. *Eur J Endocrinol* 168:315-321
18. Viardot A, Huber P, Puder JJ et al (2005) Reproducibility of nighttime salivary cortisol and its use in the diagnosis of hypercortisolism compared with urinary free cortisol and overnight dexamethasone suppression test. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5730-5736
19. Elias PC, Martinez EZ, Barone BF et al (2014) Late-night salivary cortisol has a better performance than urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 99:2045-2051
20. Ceccato F, Antonelli G, Barbot M et al (2014) The diagnostic performance of urinary free cortisol is better than the cortisol:cortisone ratio in detecting de novo Cushing's syndrome: the use of a LC-MS/MS method in routine clinical practice. *Eur J Endocrinol* 171:1-7
21. Petersenn S, Newell-Price J, Findling JW et al (2014) High variability in baseline urinary free cortisol values in patients with Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 80:261-269
22. Taylor RL, Machacek D, Singh RJ (2002) Validation of a high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for urinary cortisol and cortisone. *Clin Chem* 48:1511-1519
23. Turpeinen U, Stenman UH (2003) Determination of urinary free cortisol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest* 63:143-150
24. McCann SJ, Gillingwater S, Keevil BG (2005) Measurement of urinary free cortisol using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with the urine adapted ACS:180 serum cortisol chemiluminescent immunoassay and development of a new reference range. *Ann Clin Biochem* 42:112-118
25. Wood L, Ducrocq DH, Fraser HL et al (2008) Measurement of urinary free cortisol by tandem mass spectrometry and comparison with results obtained by gas chromatography-mass spectrometry and two commercial immunoassays. *Ann Clin Biochem* 45:380-388
26. Fong BM, Tam S, Leung KS (2010) Improved liquid chromatography-tandem mass spectrometry method in clinical utility for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Anal Bioanal Chem* 396:783-790

27. Djedovic NK, Rainbow SJ (2011) Detection of synthetic glucocorticoids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in patients being investigated for Cushing's syndrome. *Ann Clin Biochem* 48:542-549
28. Vogeser M, Seger C (2010) Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin Chem* 56:1234-1244
29. Vogeser M, Seger C (2012) LC-MS/MS in clinical chemistry. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 883-884:1-2
30. Raff H, Auchus RJ, Findling J, Nieman L (2015) Urine free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome: is it worth doing and, if so, how? *J Clin Endocrinol Metab* 100:396-397
31. Raff H (2015) Cushing syndrome: update on testing. *Endocrinol Metab Clin North Am* 44:43-50
32. Turpeinen U, Hämäläinen E (2013) Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27:795-801
33. Murphy BE (2000) How much "UFC" is really cortisol? *Clin Chem* 46:793-794
34. Horie H, Kidowaki T, Koyama Y et al (2007) Specificity assessment of immunoassay kits for determination of urinary free cortisol concentrations. *Clin Chim Acta* 378:66-70
35. Persichilli S, Gervasoni J, Cocci A et al (2012) Cortisolo libero urinario in LC-MS/MS: una valida soluzione ai limiti dei dosaggi immunometrici. *Ligand Assay* 17:43-49
36. Ching SY, Lim EM, Beilby J et al (2006) Urine free cortisol analysis by automated immunoassay and high-performance liquid chromatography for the investigation of Cushing's syndrome. *Ann Clin Biochem* 43:402-407
37. Gatti R, Antonelli G, Prearo M et al (2009) Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluid. *Clin Biochem* 42:1205-1217
38. Dorn LD, Lucke JF, Loucks TL et al (2007) Salivary cortisol reflects serum cortisol: analysis of circadian profiles. *Ann Clin Biochem* 44: 281-284
39. Gallagher P, Leitch MM, Massey AE et al (2006) Assessing cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in saliva: effects of collection method. *J Psychopharmacol* 20:643-649
40. Gröschl M, Rauh M (2006) Influence of commercial collection devices for saliva on the reliability of salivary steroids analysis. *Steroids* 71:1097-1100
41. Kidd S, Midgley P, Lone N et al (2009) A re-investigation of saliva collection procedures that highlights the risk of potential positive interference in cortisol immunoassay. *Steroids* 74:666-668
42. Raff H (2012) Cushing's syndrome: diagnosis and surveillance using salivary cortisol. *Pituitary* 15:64-70
43. Badrick E, Kirschbaum C, Kumari MJ (2007) The relationship between smoking status and cortisol secretion. *Clin Endocrinol Metab* 92:819-824
44. Kumari M, Badrick E, Chandola T et al (2009) Cortisol secretion and fatigue: associations in a community based cohort. *Psychoneuroendocrinology* 34:1476-1485
45. Tryphonopoulos PD, Letourneau N, Azar R (2014) Approaches to salivary cortisol collection and analysis in infants. *Biol Res Nurs* 16:398-408
46. Kivlighan KT, Granger DA, Schwartz EB et al (2004) Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Horm Behav* 46:39-46

47. Granger DA, Cicchetti D, Rogosch FA et al (2007) Blood contamination in children's saliva: prevalence, stability, and impact on the measurement of salivary cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone. *Psychoneuroendocrinology* 32:724-733
48. Schwartz EB, Douglas A, Granger DA (2004) Transferrin enzyme immunoassay for quantitative monitoring of blood contamination in saliva. *Clin Chem* 50: 654-656
49. Raff JL, Findling JW (1998) Late-night salivary cortisol as screening test for Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2681-2686
50. Castro M, Elias PC, Quidute AR et al (1999) Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. *J Clin Endocrinol Metab* 84:878-882
51. Yaneva M, Mosnier-Pudar H, Dugué MA et al (2004) Midnight salivary cortisol for the initial diagnosis of Cushing's syndrome of various causes. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3345-3351
52. Trilck M, Flitsch J, Lüdecke DK et al (2005) Salivary cortisol measurement--a reliable method for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113:225-230
53. Doi M, Sekizawa N, Tani Y et al (2008) Late-night salivary cortisol as a screening test for the diagnosis of Cushing's syndrome in Japan. *Endocr J* 55:121-126
54. Cardoso EM, Arregger AL, Tumilasci OR et al (2009) Diagnostic value of salivary cortisol in Cushing's syndrome (CS). *Clin Endocrinol (Oxf)* 70:516-521
55. Deutschbein T, Unger N, Hinrichs J et al (2009) Late-night and low-dose dexamethasone-suppressed cortisol in saliva and serum for the diagnosis of cortisol-secreting adrenal adenomas. *Eur J Endocrinol* 161:747-753
56. Ceccato F, Barbot M, Zilio M et al (2013) Performance of salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome, adrenal incidentaloma, and adrenal insufficiency. *Eur J Endocrinol* 169:31-36
57. Martinelli CE Jr, Sader SL, Oliveira EB et al (1999) Salivary cortisol for screening of Cushing's syndrome in children. *Clin Endocrinol (Oxf)* 51:67-71
58. Gafni RI, Papanicolaou DA, Nieman LK (2000) Night time salivary cortisol measurement as a simple, noninvasive, outpatient screening test for Cushing's syndrome in children and adolescents. *J Pediatr* 137:30-35
59. Restituto P, Galofré JC, Gil MJ et al (2008) Advantage of salivary cortisol measurements in the diagnosis of glucocorticoid related disorders. *Clin Biochem* 41:688-692
60. Masserini B, Morelli V, Bergamaschi S et al (2009) The limited role of midnight salivary cortisol levels in the diagnosis of subclinical hypercortisolism in patients with adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol* 160:87-92
61. Carrozza C, Corsello SM, Paragliola RM et al (2010) Clinical accuracy of midnight salivary cortisol measured by automated electrochemiluminescence immunoassay method in Cushing's syndrome. *Ann Clin Biochem* 47:228-232
62. Jeyaraman K, Ammini AC, Nandita G et al (2010) Late-night salivary cortisol in normal subjects and in patients with Cushing's syndrome. *Postgrad Med J* 86:399-404
63. Sereg M, Toke J, Patócs A et al (2011) Diagnostic performance of salivary cortisol and serum osteocalcin measurements in patients with overt and subclinical Cushing's syndrome. *Steroids* 76:38-42
64. Carrasco CA, García M, Goycoolea M et al (2012) Reproducibility and performance of one or two samples of salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome using an automated immunoassay system. *Endocrine* 41:487-493
65. Deutschbein T, Broecker-Preuss M, Flitsch J et al (2012) Salivary cortisol as a diagnostic tool for Cushing's syndrome and adrenal insufficiency: improved screening by an automatic immunoassay. *Eur J Endocrinol* 166:613-618

66. Belaya ZE, Iljin AV, Melnichenko GA et al (2012) Diagnostic performance of late-night salivary cortisol measured by automated electrochemiluminescence immunoassay in obese and overweight patients referred to exclude Cushing's syndrome. *Endocrine* 41:494-500
67. Bukan AP, Dere HB, Jadhav SS et al (2015) The performance and reproducibility of late night salivary cortisol (LNSC) estimation by EIA (Enzyme Immunoassay) for screening of Cushing's disease. *Endocr Pract* 21:158-164
68. Zerikly RK, Amiri L, Faiman C et al (2010) Diagnostic characteristics of late-night salivary cortisol using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4555-4559
69. Erickson D, Singh RJ, Sathananthan A et al (2012) Late-night salivary cortisol for diagnosis of Cushing's syndrome by liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76:467-472
70. Beko G, Varga I, Glaz E et al (2010) A cutoff values of midnight salivary cortisol for the diagnosis of overt hypercortisolism are highly influenced by methods. *Clin Chim Acta* 411:364-367
71. Miller R, Plessow F, Rauh M et al (2013) Comparison of salivary cortisol as measured by different immunoassays and tandem mass spectrometry. *Psychoneuroendocrinology* 38:50-57
72. Inder WJ, Dimeski G, Russell A. (2012) Measurement of salivary cortisol in 2012 - laboratory techniques and clinical indications. *Clin Endocrinol (Oxf)* 77:645-651
73. Jönsson BA, Malmberg B, Amilon A et al (2003) Determination of cortisol in human saliva using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 784:63-68
74. Raff H. (2009) Utility of salivary cortisol measurements in Cushing's syndrome and adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3647-3655
75. Carroll T, Raff H, Findling JW (2009) Late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing syndrome: a meta-analysis. *Endocr Pract* 15:335-342
76. Graham UM, Hunter SJ, McDonnell M et al (2013) A comparison of the use of urinary cortisol to creatinine ratios and nocturnal salivary cortisol in the evaluation of cyclicality in patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E72-E76
77. Raff H (2013) Update on late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing's syndrome: methodological considerations. *Endocrine* 44:346-349
78. Raff H, Carroll T (2015) Cushing's syndrome: from physiological principles to diagnosis and clinical care. *J Physiol* 593:493-506
79. Zhang Q, Dou J, Gu W et al (2013) Reassessing the reliability of the salivary cortisol assay for the diagnosis of Cushing syndrome. *J Int Med Res* 41:1387-1394
80. Chiu SK, Collier CP, Clark AF et al (2003) Salivary cortisol on ROCHE Elecsys immunoassay system: pilot biological variation studies. *Clin Biochem* 36:211-214
81. Casals G, Foj L, de Osaba MJ (2011) Day-to-day variation of late-night salivary cortisol in healthy voluntaries. *Clin Biochem* 44:665-668
82. Brescia V, Zecca C, Cardinali R, Burano R (2015) Late-night salivary cortisol (LNSC): data on biological variation. *Riv Ital Med Lab* 2015; 11: 50-51
83. Ho JT, Al-Musalhi H, Chapman MJ et al (2006) Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 91:105-114
84. Philomin V, Vessières A, Jaouen G (1994) New applications of carbonylmetal immunoassay (CMIA): a non-radioisotopic approach to cortisol assay. *J Immunol Methods* 171:201-210

85. Vogeser M, Briegel J, Jacob K (2001) Determination of serum cortisol by isotope-dilution liquid-chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Clin Chem Lab Med* 39:944-947
86. Kushnir MM, Neilson R, Roberts WL et al (2004) Cortisol and cortisone analysis in serum and plasma by atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 37:357-362
87. Roberts RF, Roberts WL (2004) Performance characteristics of five automated serum cortisol immunoassays. *Clin Biochem* 37:489-493
88. Cohen J, Venkatesh B, Tan T (2013) Comparison of the diagnostic accuracy of measured and calculated free cortisol in acutely ill patients using the Coolens equation. *Crit Care Resusc* 15:39-41
89. Dorin RI, Pai HK, Ho JT et al (2009) Validation of a simple method of estimating plasma free cortisol: role of cortisol binding to albumin. *Clin Biochem* 42:64-71
90. Reimondo G, Allasino B, Bovio S et al (2005) Evaluation of the effectiveness of midnight serum cortisol in the diagnostic procedures for Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 153:803-809
91. Barrou Z, Guiban D, Maroufi A et al (1996) Overnight dexamethasone suppression test: comparison of plasma and salivary cortisol measurement for the screening of Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 134:93-96
92. Elamin MB, Murad MH, Mullan R et al (2008) Accuracy of diagnostic tests for Cushing's syndrome: a systematic review and metaanalyses. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1553-1562
93. Kidambi S, Raff H, Findling JW (2007) Limitations of nocturnal salivary cortisol and urine free cortisol in the diagnosis of mild Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 157:725-731
94. Doi SA, Clark J, Russell AW (2013) Concordance of the late night salivary cortisol in patients with Cushing's syndrome and elevated urine-free cortisol. *Endocrine* 43:327-333
95. Atkins D, Best D, Briss PA et al (2004) Grading quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 328:1490-1494
96. Swiglo BA, Murad MH, Schünemann HJ et al (2008) A case for clarity, consistency, and helpfulness: state-of-the-art clinical practice guidelines in endocrinology using the grading of recommendations, assessment, development, and evaluation system. *J Clin Endocrinol Metab* 93:666-673

Figura 1 Algoritmo diagnostico nel sospetto di sindrome di Cushing (modificata da [42])

CLU: cortisolo libero urinario; CRO: metodo cromatografico (HPLC, LC-MS/MS); CSN: cortisolo salivare notturno; HPLC: *high performance liquid chromatography*; IMA: metodo immunometrico; LC-MS/MS: *liquid chromatography/mass spectrometry*; oDST: test di soppressione al desametasone 1 mg *overnight*; SC: sindrome di Cushing.

Tabella 1 Principali cause di sindrome di Cushing endogena (modificata da [2])

Sindrome di Cushing	Eziologia	%	F:M
ACTH-dipendente	Adenoma ipofisario ACTH-secernente (malattia di Cushing)	70	3.5:1
	Neoplasia extra-ipofisaria ACTH/CRH-secernente (sindrome da ACTH ectopico)	10	1:1
	ACTH di origine sconosciuta	< 5	5:1
ACTH-indipendente	Adenoma surrenalico	10	4:1
	Carcinoma surrenalico	5	1:1
	Iperplasia surrenalica macronodulare ACTH-indipendente (AIMAH)	< 2	1:1
	Malattia nodulare pigmentosa primaria del corticosurrene (PPNAD)	< 2	1:1

ACTH: *adrenocorticotropic hormone*; CRH: *corticotropin-releasing hormone*.

Tabella 2 Quadro clinico della sindrome di Cushing

Quadro clinico
Obesità centrale (gibbo dorsale, <i>facies lunaris</i> , regione sovraclaveare)
Cute fragili, difficoltà alla guarigione delle ferite
<i>Striae rubrae</i>
Acne
Irsutismo
Ipotrofia muscolare, miopatia
Osteopenia/osteoporosi con aumentato rischio di fratture
Arresto della crescita somatica
Ipogonadismo ipogonadotropo nel maschio, cicli oligo- o anovulatori nella femmina
Iperensione arteriosa
Intolleranza glucidica, diabete mellito
Iperlipidemia
Depressione, psicosi
Trombofilia
Immunosoppressione e facilità alle infezioni

Tabella 3 Utilità diagnostica del cortisolo libero urinario nella sindrome di Cushing

Autore	Sede	Soggetti		Metodo	Sensibilità analitica (nmol/L)	Cut-off (nmol/24 ore)	Performance diagnostica					
		Tot	SC				Sens (%)	Spec (%)	LR+	LR-	DOR	NND
Papanicolaou et al. 2002 [15]	USA	200	122	RIA con estrazione (SmithKline Bioscience Lab., King of Prussia, USA)	nr	668 (spec 100%)	56	100	∞	0,44	∞	1,8
Putignano et al. 2003 [16]	Italia	300	41	RIA con estrazione (Diagnostic Products, Los Angeles, USA)	13.80	221 (curva ROC)	98	85	6,53	0,02	277,7	1,2
Manetti et al. 2013 [17]	Italia	143	27	RIA (DSL, Webster, USA)	nr	954 (curva ROC)	93	98	46,50	0,07	651,00	1,1
Viardot et al. 2005 [18]	Svizzera	87	12	CLIA con estrazione (DPC, Los Angeles, USA)	nr	504 (curva ROC)	100	100	∞	0,00	∞	1,0
Elias et al. 2014 [19]	Brasile	75	57	LC-MS/MS	nr	124 (curva ROC)	93	79	4,43	0,09	50,0	1,4
Ceccato et al. 2014 [20]	Italia	195	43	LC-MS/MS	nr	170 (curva ROC)	95	99	95,00	0,05	1881,0	1,1
<i>Intervallo</i>						124-954	56-100	79-100				

CLIA: *chemiluminescence immunoassay*; intervallo: minimo-massimo; DOR: *diagnostic odds ratio*; LC-MS/MS: *liquid chromatography-mass spectrometry*; LR+: *likelihood ratio* positivo; LR: *likelihood ratio* negativo; NND: *number needed to diagnose*; nr: non riportato; RIA: *radioimmunoassay*; ROC: *receiver operating characteristic*; SC: soggetti con sindrome di Cushing; Sens: sensibilità; Spec: specificità; Tot: totale dei soggetti arruolati nello studio.

Dividere per il fattore di conversione (2.7588) per passare dalle unità del Sistema Internazionale (nmol/24 ore) alle unità del Sistema Convenzionale (µg/24 ore).

Tabella 4 Interferenze analitiche della determinazione immunometrica del cortisolo libero urinario

Analita interferente	% <i>cross</i>-reattività
Cortisone	1,0-54,0
11-desossicortisolo	8,9-21,6
Corticosterone	0,7-8,0
Prednisolone	2,5-65,0
Prednisone	0,3-42,9
5 β -diidrocortisolo	2,5-30,0
5-tetraidrocortisolo	0,2-30,0

Tabella 5 Confronto tra i diversi metodi per la determinazione del cortisolo salivare notturno (modificata da [42])

	EIA/ELISA (manuale)	ECLIA (automatizzato)	LC-MS/MS
Volume del campione (μ l)	50 ^a	40 ^a	100-250 (estrazione)
Sensibilità analitica (nmol/L)	0,03-0,14	0,20-0,60	0,08-2,00 ^b
Specificità	Possibile <i>cross</i> -reattività con cortisone e altri steroidi sintetici	Possibile <i>cross</i> -reattività con cortisone e altri steroidi sintetici	<i>Cross</i> -reattività poco frequente con cortisone e altri steroidi sintetici
Costi	Contenuti	Contenuti	Alti in fase di avvio
Grado di difficoltà	Minimo	Minimo	Rilevante

^a Il volume riportato è sufficiente per la determinazione in duplicato; ^b La sensibilità analitica dell'LC-MS/MS dipende dal volume di saliva dopo estrazione.

ECLIA: *electrochemiluminescence immunoassay*; EIA: *enzyme immunoassay*; ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*; LC-MS/MS: *liquid chromatography/tandem mass spectrometry*.

Tabella 6 Valutazione dell'utilità diagnostica del cortisolo salivare notturno (ore 23:00-24:00) nella sindrome di Cushing (metodi RIA)

Autore	Sede	Soggetti		Modalità raccolta	Metodo	Sensibilità analitica (nmol/L)	Cut-off (nmol/L)	Performance diagnostica					
		Tot	SC					Sens (%)	Spec (%)	LR+	LR-	DOR	NND
Adulti													
Raff et al. 1998 [49]	USA	151	39	Tampone di cotone	RIA (DPC, Los Angeles, USA)	0,41	3,6 (media+2 DS)	92	97	30,67	0,08	371,8	1,1
Castro et al. 1999 [50]	Brasile	81	33	Espettorato	RIA (Home-made)	1,71	4,6 ^a 7,7 ^b (90° percentile)	100 93	88 93	8,33 13,29	0,00 0,08	∞ 176,5	1,1 1,2
Papanicolaou et al. 2002 [15]	USA	200	122	Espettorato	RIA (Covance Laboratories, Vienna, Austria)	2,21	15,2 (spec 100%)	93	100	∞	0,07	∞	1,1
Putignano et al. 2003 [16]	Italia	300	41	Tampone di polietilene	RIA (Byk-Sangtec, Dietzenbach, Germania)	1,41	9,7 (curva ROC)	93	93	13,29	0,08	176,5	1,2
Yaneva et al. 2004 [51]	Francia	117	63	Tampone di polietilene	RIA (CIS, Gif-sur-Yvette, Francia)	0,83	5,5 (sens massima)	100	96	25,00	0,00	∞	1,0
Viardot et al. 2005 [18]	Svizzera	87	12	Tampone di polietilene	RIA (CIS, Gif-sur-Yvette, Francia)	0,80	6,1 (curva ROC)	100	100	∞	0,00	∞	1,0
Trilck et al. 2005 [52]	Germania	165	120	Tampone di polietilene	RIA (Incstar, Stillwater, USA)	2,75	4,4 (sens massima)	100	91	11,11	0,00	∞	1,1
Doi et al. 2008 [53]	Giappone	54	27	Tampone di polietilene	RIA (Diasorin, Stillwater, USA)	1,38	5,8 (curva ROC)	93	100	∞	0,07	∞	1,1
Cardoso et al. 2009 [54]	Argentina	142	21	Espettorato	RIA (DPC, Los Angeles, USA)	0,50	3,8 (curva ROC)	100	98	50,0	0,00	∞	1,0
Deutschbein et al. 2009 [55]	Germania	104	38	Tampone di polietilene	RIA (Diasorin, Stillwater, USA)	0,60	4,8 (curva ROC)	97	69	3,13	0,04	72,0	1,5
Nunes et al. 2009 [7]	Francia	126	13 ^c 14 ^d	Tampone di polietilene	RIA (Diasorin, Stillwater, USA)	0,90	12,0 ^c 8,0 ^d (curva ROC)	100 90	100 92	∞ 11,25	0,00 0,11	∞ 103,5	1,0 1,2

Manetti et al. 2013 [17]	Italia	143	27	Tampone di polietilene	RIA (Immunotech, Marsiglia, Francia)	0,83	7,6 (curva ROC)	100	98	50,0	0,00	∞	1,0
Ceccato et al. 2013 [56]	Italia	286	82	Tampone di polietilene	RIA (Radim, Roma, Italia)	1,37	14,5 (curva ROC)	96	97	32,00	0,04	776,0	1,1
Elias et al. 2014 [19]	Brasile	75	57	Tampone di polietilene	RIA (Home-made)	nr	13,4 (curva ROC)	94	95	18,80	0,06	297,7	1,1
Bambini													
Martinelli et al. 1999 [57]	Brasile	32	11	Espettorato	RIA (Home-made)	1,70	7,7 (media+2 DS)	100	95	20,00	0,0	∞	1,0
Gafni et al. 2000 [58]	USA	67	24	Espettorato	RIA (Covance Laboratories, Vienna, Austria)	2,20-3,30	7,5 (spec 100%)	93	100	∞	0,07	∞	1,1
Trilck et al. 2005 [52]	Germania	161	30	Tampone di polietilene	RIA (Incstar, Stillwater, USA)	2,75	2,7 ^e 4,7 ^f 5,2 ^g (sens massima)	100 ^e 100 ^f 95 ^g	87 ^e 100 ^f 91 ^g	7,69 ∞ 10,56	0,00 0,00 0,05	∞ ∞ 192,1	1,1 1,0 1,2
<i>Intervallo</i>						0,41-3,30	3,6-15,2	92-100	69-100				

^a Controlli sani vs pazienti con SC; ^b Soggetti obesi vs pazienti con SC; ^c Pazienti con SC conclamata; ^d Pazienti con SC subclinica; ^e 6-10 anni; ^f 11-15 anni; ^g 16-20 anni.

DOR: *diagnostic odds ratio*; intervallo: minimo-massimo; DS: deviazione standard; LR+: *likelihood ratio* positivo; LR-: *likelihood ratio* negativo; NND: *number needed to diagnose*; RIA: *radioimmunoassay*; ROC: *receiver operating characteristic*; SC: soggetti con sindrome di Cushing; Sens: sensibilità; Spec: specificità; Tot: totale dei soggetti arruolati nello studio.

Dividere per il fattore di conversione (2.7588) per passare dalle unità del Sistema Internazionale (nmol/L) alle unità del Sistema Convenzionale (µg/L).

Tabella 7 Valutazione dell'utilità diagnostica del cortisolo salivare notturno (ore 23:00-24:00) nella sindrome di Cushing (metodi ECLIA, EIA, ELISA, TR-FIA)

Autore	Sede	Soggetti		Modalità raccolta	Metodo	Sensibilità analitica (nmol/L)	Cut-off (nmol/L)	Performance diagnostica					
		Tot	SC					Sens (%)	Spec (%)	LR+	LR-	DOR	NND
Restituto et al. 2008 [59]	Spagna	189	22	Tampone di cotone	ELISA (DSL, Webster, USA)	0,027	2,2 (curva ROC)	88	82	4,89	0,15	33,4	1,4
Masserini et al. 2009 [60]	Italia	103 ^a	22 ^b	Tampone di polietilene	TR-FIA (Wallac, Turku, Finlandia)	nr	5,1 (95° percentile)	23	88	1,92	0,88	2,2	9,1
Carrozza et al. 2010 [61]	Italia	58	21	Tampone di polietilene	ECLIA (Roche, Basel, Svizzera)	0,60	8,3 (curva ROC)	100	97	33,33	0,00	∞	1,0
Jeyareman et al. 2010 [62]	India	126	33	Tampone di polietilene	ECLIA (Roche, Basel, Svizzera)	0,50	4,55 (curva ROC)	94	81	4,95	0,07	66,8	1,3
Sereg et al. 2011 [63]	Ungheria	151	23 ^c 18 ^d	Tampone di polietilene	ECLIA (Roche, Basel, Svizzera)	0,50	9,9 ^e 6,6 ^d (curva ROC)	91 72	94 82	15,17 4,00	0,10 0,34	158,4 11,7	1,2 1,8
Carrasco et al. 2012 [64]	Cile	125	26	Tampone di polietilene	ECLIA (Roche, Basel, Svizzera)	0,50	4,3 (curva ROC)	100	83	5,88	0,00	∞	1,2
Deutschbein et al. 2012 [65]	Germania	200	40	Tampone di polietilene	ECLIA (Roche, Basel, Svizzera)	0,20	6,1 (curva ROC)	95	91	10,56	0,05	192,1	1,2
Belaya et al. 2012 [66]	Russia	98 ^e 78 ^f	45	Tampone di polietilene	ECLIA (Roche, Basel, Svizzera)	nr	9,4 (curva ROC)	84	98 ^e 92 ^f	42,00 10,50	0,16 0,17	257,3 60,4	1,2 1,3
Bukan et al. 2015 [67]	India	95	28	Espettorato	EIA (Salimetrics, State College, USA)	0,082	5,0 (curva ROC)	96	100	∞	0,04	∞	1,0
<i>Intervallo</i>						0,027-0,60	2,2-9,9	23-100	81-100				

^a Pazienti con adenoma surrenalico monolaterale; ^b Pazienti con adenoma surrenalico monolaterale con ipercortisolismo subclinico; ^c Pazienti con SC conclamata; ^d Pazienti con SC subclinica; ^e Controlli sani; ^f Soggetti con obesità costituzionale, senza SC.

DOR: *diagnostic odds ratio*; ECLIA: *electrochemiluminescence immunoassay*; EIA: *enzyme immunoassay*; ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*; intervallo: minimo-massimo; LR+: *likelihood ratio* positivo; LR-: *likelihood ratio* negativo; NND: *number needed to diagnose*; ; nr: non riportato; ROC: *receiver operating characteristic*; SC: soggetti con sindrome di Cushing; Sens: sensibilità; Spec: specificità; Tot: totale dei soggetti arruolati nello studio; TR-FIA: *time-resolved fluoroimmunoassay*.

Dividere per il fattore di conversione (2.7588) per passare dalle unità del Sistema Internazionale (nmol/L) alle unità del Sistema Convenzionale (µg/L).

Tabella 8 Valutazione dell'utilità diagnostica del cortisolo salivare notturno (ore 23:00-24:00) nella sindrome di Cushing (metodi LC-MS/MS)

Autore	Sede	Soggetti		Modalità raccolta	Metodo	Sensibilità analitica (nmol/L)	Cut-off (nmol/L)	Performance diagnostica					
		Tot	SC					Sens (%)	Spec (%)	LR+	LR-	DOR	NND
Zerikly et al. 2010 [68]	USA	108	38	Espettorato	LC-MS/MS	nr	2.95 (curva ROC)	92	92	11.50	0.10	132.2	1.2
Erickson et al. 2012 [69]	USA	249	47	Tampone di polietilene	LC-MS/MS	0.11	2.10 (curva ROC)	83	84	5.19	0.20	25.6	1.5
<i>Intervallo</i>							2.10-2.95	83-92	84-92				

DOR: *diagnostic odds ratio*; intervallo: minimo-massimo; LC-MS/MS: *liquid chromatography/tandem mass spectrometry*; LR+: *likelihood ratio* positivo; LR-: *likelihood ratio* negativo; NND: *number needed to diagnose*; nr: non riportato; ROC: *receiver operating characteristic*; SC: soggetti con sindrome di Cushing; Sens: sensibilità; Spec: specificità; Tot: totale dei soggetti arruolati nello studio. Dividere per il fattore di conversione (2.7588) per passare dalle unità del Sistema Internazionale (nmol/L) alle unità del Sistema Convenzionale (µg/L).

Tabella 9 Valutazione dell'utilità diagnostica del cortisolo sierico e salivare nella sindrome di Cushing dopo test di soppressione con desametasone 1 mg overnight

Autore	Sede	Soggetti		oDST-Cortisolo sierico totale							oDST-Cortisolo salivare						
		Tot	SC	Cut-off (nmol/L)	Sens (%)	Spec (%)	LR+	LR-	DOR	NND	Cut-off (nmol/L)	Sens (%)	Spec (%)	LR+	LR-	DOR	NND
Barrou et al. 1996 [91]	Francia	91	27	100 (curva ROC)	100	87	7,69	0,00	∞	1,1	2,8 (curva ROC)	100	100	∞	0,00	∞	1,0
Viardot et al. 2005 [18]	Francia	82	12	140 (curva ROC)	83	94	13,83	0,18	76,5	1,3	1,5 (curva ROC)	100	77	4,35	0,00	∞	1,3
Cardoso et al. 2009 [54]	Argentina	142	21	50 (curva ROC)	100	100	∞	0,00	∞	1,0	2,0 (curva ROC)	100	100	∞	0,00	∞	1,0
Deuschbein et al. 2009 [55]	Germania	104	38	94 (curva ROC)	97	88	8,08	0,03	237,1	1,2	3,7 (curva ROC)	97	83	5,71	0,04	157,9	1,3
Deuschbein et al. 2012 [65]	Germania	200	40	nr	nr	nr	nc	nc	nc	nc	2,0 (curva ROC)	97	86	6,93	0,03	198,6	1,2
<i>Intervallo</i>				50-140	83-100	87-100					1,5-3,7	97-100	77-100				

Cut-off: valore soglia; DOR: *diagnostic odds ratio*; intervallo: minimo-massimo; LR+: *likelihood ratio* positivo; LR-: *likelihood ratio* negativo; nc: non calcolabile; NND: *number needed to diagnose*; nr: non riportato; oDST: test di soppressione con desametasone 1 mg overnight; ROC: *receiver operating characteristic*; SC: soggetti con sindrome di Cushing; Sens: sensibilità; Spec: specificità; Tot: totale dei soggetti arruolati nello studio. Dividere per il fattore di conversione (2.7588) per passare dalle unità del Sistema Internazionale (nmol/L) alle unità del Sistema Convenzionale (µg/L).