

Ruolo del Laboratorio nello studio della patologia surrenalica: logiche di intervento e strumenti di intervento

R.M. Dorizzi, P. Maltoni

Laboratorio Unico di AvR, Pievesestina di Cesena (FC)

Riassunto

La sindrome di Cushing, una condizione di ipercorticismo protratta, può derivare da numerose condizioni (tumori ipofisari che producono ACTH, tumori surrenalici benigni e maligni che producono cortisolo, tumori extrapituitarici che producono ACTH o CRH). La sindrome ipofisaria, o malattia di Cushing, è la forma più comune (causa circa il 70% dei casi) ed è più frequente nelle donne in età fertile. Nel 1964 Nugent concludeva, con un approccio bayesiano molto innovativo, che i pazienti con obesità centrale, astenia, pletora, acne, strie, irsutismo, ecchimosi, osteoporosi ed edema avevano una probabilità di malattia intorno al 95%. Nel 2008 Endocrine Society ed European Society of Endocrinology hanno predisposto congiuntamente delle Linee guida per la diagnosi della sindrome di Cushing.

Il primo esame da eseguire deve possedere una accuratezza diagnostica elevata e può essere uno dei seguenti: cortisolo urinario (almeno due raccolte), cortisolo salivare notturno (due prelievi), test di soppressione al Desametasone a 1 mg (overnight) o 2 mg (48 ore). Si raccomanda di non eseguire i seguenti esami: misurazione della concentrazione di cortisolo ed ACTH al di fuori dell'orario compreso tra le 23 e le 24, 17 chetosteroidi urinari, test di tolleranza all'insulina, test al loperamide, esami per stabilire la causa della sindrome di Cushing (come imaging ipofisario e DST 8 mg). La determinazione del cortisolo in siero, urina e saliva rimane fondamentale nella diagno-

stica delle patologie surrenaliche ma, come in tutte le determinazioni ormonali, il laboratorista ed il clinico devono conoscerne caratteristiche e limiti. L'accuratezza delle tre determinazioni è molto diversa ed i risultati prossimi alla sensibilità funzionale del dosaggio possono essere spesso spiegati dalla variabilità analitica. I metodi RIA sono stati sostituiti quasi completamente dai metodi automatici non isotopici, mentre i metodi cromatografici, anche se molto più accurati, sono quasi esclusivamente utilizzati nell'ambito della ricerca. I metodi in Cromatografia Liquida (LC e LC-MS/MS) sono in grado di separare e quantificare il cortisolo totale anche in presenza di altri steroidi e metaboliti ma richiedono più tempo, più lavoro e più esperienza. La determinazione del cortisolo nella saliva è risultata avere dei vantaggi rispetto alla determinazione nel siero. Vi sono già numerosi articoli sulla convenienza di usare tale matrice biologica per una valutazione non invasiva della concentrazione degli steroidi liberi in ambiti come endocrinologia, neuroendocrinologia e medicina dello sport. Continuano, tuttavia, ad essere metodi non adottati dalla maggioranza dei laboratori. Abbiamo introdotto nella pratica routinaria del nostro laboratorio la determinazione del cortisolo salivare dopo avere tentato di ottimizzare il metodo estrattivo per il cortisolo libero urinario, avere verificato l'intervallo di riferimento del cortisolo su siero e avere valutato il metodo automatico ECLIA per misurare il cortisolo salivare.

Summary

The role of the laboratory in the investigation of adrenal disease: logic and tools

Cushing syndrome (i.e. sustained hypercortisolism) may result from several conditions (ACTH-producing pituitary tumors, benign or malign adrenal tumours secreting corti-

sol, extrapituitary tumours producing ACTH or CRH). The pituitary syndrome, Cushing disease, is the most common accounting for approximately 70% of the cases (generally women of childbearing age). According to Nugent's pioneering Bayesian approach the patients suffering from central obesity, weakness, plethora, acne, striae, hirsutism, ec-

chymoses, osteoporosis and edema the calculated probability of disease is approximately 95%. In 2008 Endocrine Society and European Society of Endocrinology jointly published guidelines for the diagnosis of Cushing syndrome. The initial testing requires a high diagnostic accuracy: urinary cortisol (at least 2 assays), late-night salivary cortisol (2 assays), 1 mg overnight dexamethasone suppression test (DST); longer low dose DST (2 mg/d 48h). On the contrary, the following tests are not recommended: random serum cortisol and ACTH, urinary 17 keto-steroids, insulin tolerance test, loperamide test, tests designed to determine the cause of Cushing disease (e.g. pituitary and adrenal imaging, 8 mg DST). The assay of cortisol in urine and saliva are pivotal in the diagnosis of adrenal diseases but laboratorians and clinicians must understand their features and their limits. The accuracy of the different assays can be very different and the results near the functional sensitivity of the assay can be due to

the analytical variability. The RIA methods have been almost completely superseded by non isotopic automated analyzers while chromatographic techniques, much more accurate, are employed almost exclusively by research laboratories. Liquid chromatography and LC-MS/MS allow separation and quantitation of total cortisol also in presence of other steroids and metabolites. Many papers report the use of saliva sample for carrying out investigations in Endocrinology, Neuro-endocrinology, Sport medicine even if very few clinical laboratories measure analytes in saliva. We have recently introduced in our laboratory the cortisol measurement in saliva after we: 1) discarded the urinary assay for inaccuracy of the extraction step, 2) verified with indirect methods both the reference interval in serum and in saliva (midnight).

Key-words: cortisol, adrenal, ACTH, CRH, Cushing, dexamethasone suppression test, saliva, RIA, liquid chromatography.

Introduzione

Il clinico richiede gli esami di laboratorio ed integra i risultati al quadro fisio-patologico per arrivare ad un giudizio che può essere diagnostico, di valutazione dell'andamento della condizione del paziente o dell'effetto della terapia. Un dato di laboratorio fornisce un'informazione utile solo se è richiesto con uno specifico obiettivo che il clinico deve basare sulla comprensione della fisiopatologia del disordine o dei disordini che sta considerando (Fig. 1)¹.

La diagnosi di sindrome di Cushing rappresenta uno dei problemi più impegnativi della diagnostica endocrinologica; le manifestazioni cliniche dell'esposizione ad una concentrazione eccessiva (endogena o esogena) di glucocorticoidi sono, infatti, proteiformi e possono essere molto sfumate. L'ipercortisolismo è una patologia rara, ma è spesso considerata come possibile diagnosi in pazienti con obesità, ipertensione e diabete. La terapia dei pazienti in cui sia stato individuato, anche incidentalmente, un ipercortisolismo porta ad un miglioramento del diabete, dell'ipertensione e dell'obesità che hanno eventualmente sviluppato suggerendo l'utilità della diagnosi precoce. Dato che la diagnosi clinica non è sempre evidente, lo screening non solo è "mandatorio" quando il rischio è elevato, ma è stato proposto anche quando è modesto. Il clinico si può, quindi, sentire obbligato a richiedere esami di laboratorio per escludere la sindrome di Cushing come causa trattabile di queste condizioni cliniche.

La sindrome di Cushing può derivare da numerose condizioni: tumori ipofisari che producono ACTH, tumori surrenalici (benigni e maligni) che producono cortisolo, tumori extrapituitarici che producono ACTH o CRH. La sindrome ipofisaria, o malattia di Cushing, è la forma più comune (causa circa il 70% dei casi) ed è più frequente nelle donne in età fertile. Le altre due forme sono più rare; i tumori surrenalici sono più frequenti in età pediatrica, mentre quelle ectopiche sono più frequenti in età più avanzata. Non va dimenticata la sindrome di Cushing derivata da somministrazione esogena di corticosteroidi.

La stima delle probabilità pre-test. Pazienti con sindrome di

Cushing si presentano in genere con un quadro clinico tipico: facies a luna, obesità centrale, pletora, strie rubre, ecchimosi, astenia dei muscoli prossimali ed osteoporosi. Questo è un quadro sempre meno frequente e, soprattutto nei pazienti con produzione ectopica di ACTH, possono essere caratterizzati da alcalosi ipokaliemica metabolica ed edema, piuttosto che da obesità, strie ed ipertensione (presente con concentrazioni più elevate di cortisolo ed in caso di malattia di durata più breve)².

Non esistono dati affidabili sull'incidenza e la prevalenza della sindrome di Cushing; si tratta, tuttavia, di una patologia rara con un'incidenza annuale di 4-5 casi/milione/anno e lieve prevalenza nel sesso femminile. Le forme subcliniche sono più frequenti. Eseguendo uno *screening* in pazienti con incidentaloma surrenalico, la prevalenza sale al 5-20% e in pazienti con diabete mellito all'1-5%.

Risale a circa 50 anni fa il primo studio sistematico sull'utilità delle informazioni cliniche nella valutazione della probabilità di diagnosi di sindrome di Cushing. La Figura 2 riporta i dati di Sensibilità, Specificità, Quoziente di probabilità positivo e Quoziente di probabilità negativo, Odds Diagnostic Ratio e Number Needed to Diagnosis. Nel 1964 Nugent concludeva con un approccio bayesiano molto innovativo che, anche assumendo che la prevalenza della malattia fosse dello 0.1%, i pazienti con obesità centrale,



Figura 1. Struttura ciclica dell'uso dei risultati degli esami di laboratorio.

astenia, pletora, acne, strie, irsutismo, ecchimosi, osteoporosi ed edema avevano una probabilità di malattia intorno al 95%³. Analogamente i pazienti anche con solo quattro segni (ipokalemia, astenia, ecchimosi e osteoporosi) avevano una probabilità di malattia intorno all'80%. Al contrario, la probabilità di malattia nei pazienti con tre segni generici come ipertensione, edema ed irsutismo era intorno al 3%. La maggioranza dei molti pazienti che si presentano con segni e sintomi che sono comuni alla popolazione generale (ipertensione, aumento di peso, depressione) hanno una produzione di cortisolo nei limiti e non hanno la sindrome di Cushing, altri hanno un lieve ipercortisolismo causato da disordini psichiatrici, obesità patologica, diabete mellito non controllato. Si tratta del cosiddetto "pseudo-Cushing" e sono difficili da discriminare dalla sindrome di Cushing.

Può essere utile confrontare come si è modificato l'approccio alla diagnostica di laboratorio in un decennio confrontando le Figure 2 e 3. La Figura 3 conferma che anche 10 anni fa l'importanza della determinazione del cortisolo al mattino era talmente marginale da non farlo nemmeno contemplare tra gli esami diagnostici. Solo la concentrazione di cortisolo al pomeriggio o a mezzanotte poteva essere utile dal punto di vista diagnostico. E' importante considerare che i valori di specificità del 67% e del 96% sono stati ottenuti considerando come soggetti di controllo non soggetti sani ma, correttamente, pazienti in cui si sospettava la patologia. Risultati ancora più convincenti erano ottenuti in pazienti ospedalizzati che avevano dormito fino a pochi minuti prima del prelievo. La determinazione del cortisolo urinario sfruttava il fatto che il cortisolo circolante, una volta saturata la capacità delle proteine leganti, era filtrato rapidamente a livello del glomerulo. Va rilevato che la sensibilità e la specificità del cortisolo urinario indicate nella Figura 3 riguardano pazienti in cui si sospetta la sindrome di Cushing; la specificità supera il 99% rispetto a soggetti normali e il 95% nei soggetti obesi. La specificità diminuisce drammaticamente in presenza di stress e nel corso di gravidanza; il 30-40% dei pazienti con ma-

PATOLOGIA	SENS	SPEC	LR+	LR-	DOR	NND
	%	%				
Obesità centrale	90	71	3.1	0.3	22.0	1.6
Astenia	65	93	9.3	0.1	24.7	1.7
Pletora	82	69	2.6	0.4	10.1	2.0
Leucociti > 11000	58	70	1.9	0.5	3.2	3.6
Acne	52	76	2.2	0.5	3.4	3.6
Strie pigmentate	46	78	2.1	0.5	3.0	4.2
Pressione diastolica > 105 mm Hg	39	83	2.3	0.4	3.1	4.5
Edema con segno della fovea	38	83	2.2	0.4	3.0	4.8
Irsutismo	50	71	1.7	0.6	2.4	4.8
Ecchimosi	53	94	8.8	0.1	17.7	2.1
Potassio < 3.7 mmol/L	25	96	6.3	0.2	8.0	4.8
Oligomenorrea	72	49	1.4	0.7	2.5	4.8
OGTT alterato	88	23	1.1	0.9	2.2	9.1
Obesità generalizzata	3	38	0.048	20.667	0.019	-1.695
Osteoporosi (diagnosi Precoce)	26	94	4.3	0.2	5.5	5.0
Osteoporosi (diagnosi Tardiva)	64	97	21.3	0.0	57.5	1.6

Figura 2. Caratteristiche operative dei segni e sintomi clinici nella diagnosi di ipercortisolismo. Se=Sensibilità, Sp= Specificità, LR+=Quoziente di probabilità positivo; LR- = Quoziente di probabilità negativo, DOR= Odds Diagnostic Ratio; NND Number Needed to Diagnose (da Rif. 2 e 4 modificati).

ESAME DIAGNOSTICO	Valore di cut-off	SENS	SPEC	LR+	LR-	DOR	NND
	%	%	%				
P- Cortisolo (sera)	13 µg/dL	83	67	2.5	0.3976	9.9	2.0
P- Cortisolo (mezzanotte)	5 µg/dL	96	96	24.0	0.0417	576.0	1.1
U-Cortisolo (24 ore)	20 µg/dL	94	91	10.4	0.0957	158.4	1.2
Desametasone (singola dose)	3.5 µg/dL	98	85	6.5	0.1531	277.7	1.2
Desametasone (bassa dose) U-cort	0.026 µg/dL	95	97	31.7	0.0316	891.0	1.1
Desametasone (bassa dose) P-cort	2 µg/dL	90	99	90.0	0.0111	9000.0	-1.0

Figura 3. Caratteristiche operative degli esami di laboratorio nella diagnosi di ipercortisolismo. Se=Sensibilità, Sp= Specificità, LR+=Quoziente di probabilità positivo; LR- = Quoziente di probabilità negativo, DOR= Odds Diagnostic Ratio; NND Number Needed to Diagnose (da Rif. 2 e 4 modificati).

lattia acuta o in attesa di intervento chirurgico o con depressione mostrano concentrazioni elevate di cortisolo.

Nel 2008 The Endocrine Society, congiuntamente all'European Society of Endocrinology, ha predisposto delle Linee guida per la diagnosi della sindrome di Cushing. Le raccomandazioni sono basate su una revisione sistematica condotta secondo i criteri GRADE per descriverne la qualità e la forza⁵. Le raccomandazioni "forti" sono raccomandate; quelle "deboli" solo suggerite. Il percorso formale ha comportato la revisione ed approvazione da parte del Clinical Guidelines Subcommittee (CGS) della Endocrine Society e del Clinical Affairs Core Committee, da parte dei membri della Società che hanno potuto esprimere i loro commenti via web e dal The Endocrine Society Council. Le conclusioni sono state: 1) va verificato preliminarmente che non siano assunti glucocorticoidi esogeni; 2) gli esami vanno limitati ai soggetti con caratteristiche multiple e progressive compatibili con la sindrome. Quando il risultato degli esami di primo livello è positivo, le indagini devono essere proseguite per individuare la causa della sindrome di Cushing. I pazienti con un risultato nei limiti riconfermato non devono essere sottoposti ad ulteriori valutazioni. Sono raccomandati approfondimenti nei casi in cui i risultati degli esami di screening siano concordemente positivi, in quelli in cui si sospetti un ipercortisolismo ciclico o se compaiono ulteriori segni/sintomi clinici dopo il riscontro di risultati iniziali nei limiti.

Chi va investigato? E' raccomandata una attenta anamnesi clinica e farmacologica. Non deve essere sottoposto ad accertamenti il soggetto che assume corticosteroidi per via orale, rettale, inalatoria e iniettiva. Esiste ampia evidenza che il trascurare questa precauzione è associato a molti effetti indesiderati senza portare vantaggi visto che numerose cause fisio-patologiche e molti farmaci possono modificare la concentrazione del cortisolo (Tab. I e II). Le linee guida del 2008 riprendono le indicazioni di Nugent del 1964 circa il quadro clinico tipico, anche se poco sensibile, della sindrome di Cushing che comprende: fragilità della pelle, pletora al viso (facies lunare), astenia dei muscoli prossimali, strie "rubre", in età pediatrica: aumento di peso con riduzione della velocità di crescita³. Meno specifici sono invece altri sintomi come depressione, astenia, aumento di peso, anomalie nelle mestruazioni e segni come gibbo dorsale, obesità, edema periferico, acne, irsutismo. Considerata la bassa prevalenza della sindrome di Cushing, è raccomandato non lo screening generalizzato ma lo studio di pazienti con molti dei segni e sintomi caratteristici, soprattutto se numerosi e ingravescenti ovvero se ci si trova di fronte a pazienti con patologie come osteoporosi e iper-

Tabella I. Alterazioni delle concentrazioni di cortisolo da cause fisiopatologiche.

Diminuite da	Acromegalia (per ridotta attività della 11 β - idrossisteroide-DH a livello epatico)
	Diabete mellito
Aumentate da	Stress
	Gravidanza (per aumento di CBG)
	Disfunzione epatica e renale (per ritardato metabolismo di CBG)
	Malnutrizione
	Obesità (in realtà vi è riduzione dei livelli di cortisolemia e aumentato metabolismo con conseguente incremento di CLU)
	Anoressia nervosa
	Depressione (per aumento centrale con dinamiche simili al Cushing)
	Deficit di GH

Tabella II. Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di cortisolo.

Diminuiti da	Androgeni
	Ormoni tiroidei
	Aminoglutetimide, chetoconazolo
	Mitotane
	Rifampicina
	Fenobarbital
	GH
	Insulina
Aumentati da	Terapia estrogenica (per aumento di CBG)
	Alcool

tensione che insorgono in età più precoce rispetto all'usuale.

Esame iniziale

Il primo esame da eseguire deve possedere un'accuratezza diagnostica elevata: cortisolo urinario (almeno due raccolte), cortisolo salivare notturno (almeno due prelievi), test di soppressione al desametasone (DST) a 1 mg (overnight) o 2 mg (48 ore). E' raccomandato, invece, di non eseguire gli esami seguenti: misurazione di cortisolo ed ACTH al di fuori dell'orario compreso tra le 23 e le 24, 17-chetosteroidi urinari, test di tolleranza all'insulina, test al loperamide, test per stabilire la causa della sindrome di Cushing (come imaging ipofisario e DST 8 mg). Il paziente con un risultato alterato deve consultare un endocrinologo e sottoporsi ad un secondo esame, uno dei precedenti o uno a scelta tra la determinazione di cortisolo sierico a mezzanotte o il test al desametasone-CRH.

Casi particolari: alcuni quadri clinici caratteristici della sindrome di Cushing possono essere presenti in condizioni come gravidanza, depressione ed altre patologie psichiatriche, alcolismo, resistenza ai glucocorticoidi, obesità patologica, diabete mellito poco controllato.

Gravidanza: è raccomandato di non usare il DST.

Epilessia: è raccomandato di non usare il DST (i farmaci anticomiziali accelerano la clearance del DST) e di usare la determinazione del cortisolo in sangue, saliva ed urine.

Insufficienza renale: è suggerito usare il DST piuttosto che l'esame nelle urine.

Cushing ciclico: è suggerita la determinazione del cortisolo nelle urine piuttosto che il DST.

Le LG del 2008, riprendendo l'approccio usato da Nugent, pongono l'accento sull'importanza cruciale della

presenza di segni e sintomi nella selezione dei soggetti da avviare alla diagnosi, in particolare quelli con elevato potere discriminante (come miopia, pletora, strie rubre, fragilità cutanea) e della possibilità di valutare nel tempo l'evoluzione del quadro. L'esame di fotografie degli anni precedenti può essere utile per valutare l'evoluzione nel tempo. In età pediatrica sensibilità e specificità dell'associazione tra diminuita crescita ed aumento del peso sono molto alte; è opportuno valutare solo i bambini obesi con una crescita ritardata.

E' stato riportato che una percentuale tra il 2 ed il 3.3% dei pazienti con diabete mellito non controllato presenti una sindrome di Cushing o un ipercortisolismo lieve (nella maggior parte dei casi da adenoma surrenalico monolaterale); l'1% dei casi di diagnosi recente di diabete mellito presenta una malattia di Cushing confermata chirurgicamente; mentre quasi il 6% dei pazienti con diabete mellito, ipertensione e/o sindrome dell'ovaio policistico ha la sindrome di Cushing. Va peraltro rilevato che non tutti i casi di ipertensione e diabete miglioravano dopo terapia chirurgica.

A causa della rarità della sindrome di Cushing e della elevata prevalenza di condizioni come diabete mellito, obesità e depressione, gli esami di screening hanno un elevato rischio di risultati falsi positivi. Gli esami di approfondimento e l'effetto di *labelling* che ne consegue e l'eventuale terapia possono causare danni e ostacolare la diagnosi della reale causa e la terapia. Va anche ricordato che recentemente l'utilità di uno screening ampio tra i pazienti in soprappeso/obesi⁶ e con diabete mellito⁷ non è stato confermato.

L'obiettivo deve essere quello di ridurre i risultati falsi positivi, in particolare nei pazienti con sintomatologia sfu-

mata, nei quali i benefici dell'intervento non sono provati. La sensibilità deve essere alta nei quadri che comportano un'elevata probabilità pre-test; in questo caso vanno privilegiati gli esami più pratici e meno costosi.

Cortisolo

La determinazione del cortisolo in siero, urina e saliva rimane fondamentale nella diagnostica delle patologie surrenaliche, ma, come in tutte le determinazioni ormonali, il laboratorista ed il clinico devono conoscerne caratteristiche e limiti. L'accuratezza è molto diversa e i risultati prossimi alla sensibilità funzionale del dosaggio possono essere spesso spiegati dalla variabilità analitica. I metodi RIA sono stati sostituiti quasi completamente dai metodi automatici non isotopici, mentre i metodi cromatografici, anche se molto più accurati, sono utilizzati quasi esclusivamente nell'ambito della ricerca. I metodi in cromatografia liquida (LC ed LC-MS/MS), in grado di separare e quantificare il cortisolo totale anche in presenza di altri steroidi e metaboliti, richiedono più tempo, più lavoro e più esperienza. Metodi diversi possono avere intervalli di riferimento sostanzialmente diversi. I metodi immunometrici non sottoposti ad estrazione possono essere influenzati da cross-reazioni con metaboliti del cortisolo e glucocorticoidi sintetici; mentre i metodi cromatografici, anche se non suscettibili a questi problemi subiscono le interferenze di farmaci come la carbamazepina e il fenofibrato (Tab. I e II)⁸. Va tenuto conto che i metodi cromatografici, anche se ben correlati, danno risultati molto più bassi rispetto ai metodi RIA⁹. Roberts et al. hanno confrontato le prestazioni di cinque metodi automatici per la determinazione del cortisolo: Access (Beckman, Fullerton, CA, USA), Advia Centaur (Siemens Healthcare, Tarrytown, NY, USA), AxSYM (Abbott, Chicago, USA), Elecsys 2010 (Roche, Mannheim, Germania) ed Immulite 2000 (Siemens Healthcare, Milano)¹⁰. AxSYM ha dato i valori più bassi e Immulite i valori più alti di cortisolo. Il metodo AxSYM è stato standardizzato impiegando materiale di riferimento fornito dell'Institute for Reference Material and Measurements/International Federation for Clinical Chemistry 451 (IRMM/IFCC-451). La slope della retta di regressione dei risultati ottenuti con AxSYM rispetto ai valori ottenuti con Gas cromatografia/Spettrometria di massa a diluizione isotopica è risultata di 1.02 e l'intercetta di 0.7 µg/dl. Non sono forniti dati circa la standardizzazione di Access, anche se l'inserito del produttore dichiara che i calibratori sono tracciabili al materiale di riferimento USP (United States Pharmacopeia). L'inserito di Advia Centaur indica che il metodo è standardizzato e confermato con Gas cromatografia/Spettrometria, ma non sono fornite specifiche, mentre quello di Elecsys afferma che il recupero è compreso tra l'89% e il 111% rispetto alla Gas cromatografia/Spettrometria di massa a diluizione isotopica. L'inserito di Immulite 2000 non fornisce informazioni sulla standardizzazione della metodica; la slope ottenuta dal confronto di Immulite 2000 vs AxSYM ed Elecsys era compresa, rispettivamente, tra 1.23 ed 1.17 è compatibile con un bias positivo di Immulite 2000. Tutti i metodi hanno dimostrato una linearità accettabile con AxSYM, una deviazione minima dai valori target (deviazione massima del 5.2%) ed una imprecisione totale inferiore al 10% nelle tre concentrazio-

ni esaminate con l'eccezione di AxSYM ed Immulite 2000 alla concentrazione più bassa di cortisolo (30 e 27.2 µg/L) con un CV rispettivamente del 20.3 e del 10.8% e di Advia Centaur nella concentrazione intermedia (220 µg/L: CV 10.3%). Elecsys 2010 ha dimostrato la migliore precisione alle tre concentrazioni investigate (30, 180 e 283 µg/L; CV rispettivo di 6.3, 2.9 e 3.5%); tale precisione è particolarmente importante alle basse concentrazioni rilevate, per esempio, nei campioni di saliva, ovvero per la classificazione corretta del test di soppressione al desametasone in cui la diagnosi è basata sul valore di cut-off di 5 µg/dl, di 3 o di 1.8 µg/dl. Roberts et al. hanno dimostrato un buon accordo tra i diversi metodi con l'eccezione di due campioni che sono risultati > 63 mg/L se analizzati con Elecsys. La differenza delle medie ha dimostrato un bias positivo di Advia Centaur e Immulite 2000 ed uno negativo di AxSYM ed Elecsys rispetto ad Access. Advia Centaur AxSYM ed Elecsys hanno mostrato un trend negativo con l'aumentare della concentrazione di cortisolo. I due risultati ottenuti da Roberts et al. marcatamente più elevati sono verosimilmente legati ad una sostanza cross-reagente che potrebbe essere uno steroide endogeno o esogeno. In assenza d'informazioni su sesso, diagnosi ed eventuali farmaci assunti si può solamente rilevare che il metodo Elecsys è sensibile ad un numero maggiore di steroidi ed in misura più rilevante. Per esempio i pazienti con deficit di 21-idrossilasi possono presentare elevate concentrazioni di 21-idrossicortisolo (Fig. 4). Il metodo Elecsys dichiara una cross-reazione con il 21-idrossilasi del 45.4%, dieci volte maggiore di quella dichiarata da Advia Centaur (4.5%), mentre non sono dichiarate quelle di Access, AxSYM e Immulite 2000. E' confermato, quindi che, sia pure con entità diversa, i metodi immunologici non sono appropriati per la quantificazione del cortisolo nei pazienti con deficit della 21-idrossilasi.

La determinazione del cortisolo libero richiede procedure complesse, lunghe e costose basate su ultrafiltrazione, dialisi all'equilibrio e gel filtrazione o metodi indiretti basati sulla misura del cortisolo totale e della Cortisol Binding

Autore	Metodo	Cut-off µg/dl	SENS	SPEC	LR+	LR-	DOR	NND
Raff et al	RIA	0.13	92	99.9	920.00	0.080	11489	1.09
Putignano et al	RIA	0.35	92.7	93.1	13.43	0.078	171	1.17
Yaneva et al	RIA	0.2	99.9	96	24.98	0.001	23976	1.04
Viardot et al	RIA	0.22	99.9	99.9	999.00	0.001	998001	1.00
Doi et al	RIA	0.021	93	99.9	930.00	0.070	13272	1.08
Papanicolau et al	FPIA	0.55	93	99.9	930.00	0.070	13272	1.08
Castro et al	RIA	0.28	99.9	87	7.68	0.001	6686	1.15
Restituito et al	ELISA	0.08	88	82	4.89	0.146	33	1.43
Nunes et al	RIA	0.4	99.9	99.9	999.00	0.001	998001	1.00
Beko et al	RIA	0.29	99.9	71	3.44	0.001	2446	1.41
Beko et al	ECLIA	0.35	99.9	89	9.08	0.001	8083	1.12
Carrozza et al	ECLIA	0.3	99.9	97.4	38.42	0.001	37424	1.03
Carrozza et al	ECLIA	0.2	99.9	94.9	19.59	0.001	18589	1.05
Carrozza et al	ECLIA	0.4	67	97	22.33	0.340	66	1.56
Jeyaraman K	ECLIA	0.4	69.2	99.9	692.00	0.308	2245	1.45
Jeyaraman K	ECLIA	0.16	93.9	81.1	4.97	0.075	66	1.33
Trilck M	RIA	0.19	99.9	87.6	8.06	0.001	7057	1.14

Figura 4. Prestazioni diagnostiche dei due cut-off impiegati da Beko et al. confrontati con quelli della letteratura (per consentire il calcolo di DOR e NDD la sensibilità e specificità del 100% sono state convertite in 99.9%).

Globulin (CBG). Limiti importanti sono le variazioni di capacità legante della CBG in caso di alterazioni conformazionali della proteina e l'indisponibilità di metodi automatici.

La determinazione del cortisolo libero urinario ha rappresentato per molti anni, dal 1970, il metodo di riferimento, poiché l'analita è filtrato non modificato dal rene e fornisce un'informazione integrata consentendo la determinazione del cortisolo non legato alle proteine. Anche se la misura non è influenzata da condizioni e farmaci che alterano la concentrazione della CBG quando si impiegano metodi immunometrici, il numero delle sostanze interferenti e l'entità della cross-reazione non sono sotto controllo. Steroidi sintetici come fludrocortisone, prednisolone, metil-prednisolone, spironolattone, carbamazepina, fenofibrato, desametasone e 17-idrossiprogesterone e coniugati glucuronidi come 5 α tetraidrocortisolo (5 α -THF), cortisone, 6 α -metilprednisolone, e 11-deossicortisolo possono causare le notevoli differenze che si rilevano nei risultati di metodi diversi (Tab. III)¹¹⁻¹³.

La misurazione del cortisolo nelle urine senza estrazione è influenzata da interferenze di steroidi e coniugati che possono essere presenti nelle urine ad elevate concentrazioni. L'estrazione con solventi organici può ridurre significativamente, anche se non completamente, le interferenze e viene quindi, di norma, raccomandata. D'altra parte sono stati proposti e sono in uso dei metodi automatici in chemiluminescenza diretti senza estrazione che hanno dimostrato di ottenere valori di concentrazione molto più alti (almeno il 50%, anche se sono riportati valori più alti dell'80%)¹⁴. Sono stati proposti come rimedi l'impiego di Intervalli di Riferimento idonei e l'adozione di una nomenclatura più appropriata: i "corticoidi liberi urinari" appare un termine più corretto quando l'analisi è eseguita con metodi immunometrici. Infatti, i metodi descritti in letteratura con cross-reattività molto bassa per i principali cortisonici sono metodi RIA poco o nulla presenti sul mercato italiano.

In conclusione, anche se il cortisolo libero urinario non è influenzato da condizioni o farmaci che alterano la con-

Tabella III. Cross-reattività per la determinazione del cortisolo con metodi automatici come indicati dal produttore.

Composti	Access (%)	Advia (%)	AxSYM (%)	Elecsys 2010 (%)	Immulite 2000 (%)
Corticosterone	4.7	2.8	8.0	5.8	7.5
Cortisone	14.5	7.4	1.4	0.3	1.0
11-Deossicorticosterone	1.4	0.4	NI	0.7	NR
11-Deossicortisolo	21.6	7.3	13.6	4.1	1.6
21-deossicorticosterone	NI	0.2	NI	NI	0.2
21-Deossicortisolo	NI	4.5	NI	45.4	NI
Desametasone	0.3	0.2	2.0	0.08	NR
17- α Idrossiprogesterone	1.9	0.5	NI	1.5	0.2
Prednisolone	40.3	27	NI	171	65
Prednisone	2.8	6.6	NI	0.28	6.1
Progesterone	0.5	NR	NI	0.35	NR
6- β -idrossicortisolo	NI	NI	NI	158	NI
allotetraidrocortisolo	NI	4.6	NI	165	NI
6- α -metilprednisolone	NI	20.9	NI	389	NI
Aldosterone	NI	0.1	NI	NI	NI
11 β -idrossiprogesterone	NI	0.5	NI	NI	NI
Androstenedione	NI	NI	NI	NI	NI
17 β -idrossipregnanolone	NI	NI	NI	NI	NI
11-keto-androsterone	NI	0.2	NI	NI	NI
11-keto-etiocholanolone	NI	NI	NI	NI	NI
β -cortolo	NI	NI	NI	NI	NI
Pregnanetriolo	NI	NI	NI	NI	NI
β -cortolone	NI	NI	NI	NI	NI
Pregnenolone	NI	NI	NI	NI	NI
β -cortolo	NI	NI	NI	NI	NI
Progesterone	NI	NI	NI	NI	NI
β -cortolone	NI	NI	NI	NI	NI
Spironolattone	NI	NI	NI	NI	0%
Deidrocorticosterone	NI	0.5	NI	NI	NI
Testosterone	NI	NI	NI	NI	NI
Tetraidrocortisolo	NI	NI	NI	NI	NI
Tetraidrocortisone	NI	0.5	NI	NI	0%
Tetraidro-11-deossicortisolo	NI	0,2	NI	NI	NI
20 α -diidrocortisolo	NI	0,5	NI	NI	NI

NI = non indicato dal produttore

NR = Non rilevabile

centrazione della CBG, risultati falsi negativi possono essere riscontrati nell'insufficienza renale (quando la clearance della creatinina è <60 ml/min) e falsi positivi quando la durata della raccolta supera le 24 ore ovvero il volume di liquidi assunti supera i 5 litri. Va ricordato inoltre che il cortisolo libero urinario deve essere misurato su almeno due raccolte successive.

E' risultato che la determinazione del cortisolo nella saliva ha dei vantaggi rispetto alla determinazione nel siero. Vi sono oramai numerosi articoli convincenti sulla convenienza di usare tale matrice per una valutazione non invasiva della concentrazione degli steroidi liberi in numerosi ambiti quali l'endocrinologia, la neuroendocrinologia, la medicina dello sport. Continuano, tuttavia, ad essere metodi non adottati dalla maggioranza dei laboratori¹⁵. Il cortisolo libero biologicamente attivo nel siero è in equilibrio con quello nella saliva; quest'ultimo non è influenzato dalla velocità di produzione dalla saliva. E' importante rilevare che l'aumento della concentrazione del cortisolo nel siero è seguito dopo pochi minuti dall'aumento della concentrazione del cortisolo nella saliva ed, in generale, i profili della concentrazione nel siero e nella saliva sono sincroni.

La saliva è prodotta da tre ghiandole salivari: parotide, che produce una secrezione sierosa di tipo acquoso, sottomascellare, che produce una secrezione mista sierosa e mucosa, e sottolinguale, che produce una secrezione prevalentemente mucosa. Gli steroidi arrivano nella saliva attraverso diffusione intracellulare (nel caso degli steroidi non coniugati lipo-solubili) e ultrafiltrazione. Nel secondo caso le molecole con un peso molecolare inferiore a circa 1900 kDa non legate alle proteine possono passare attraverso le "tight junction" delle cellule acinose insieme all'acqua. La concentrazione degli steroidi non coniugati salivari riflette la concentrazione libera nel siero. Il cortisolo diffonde liberamente attraverso le cellule acinose che presentano poca differenza agli estremi superiori ed inferiori della velocità di produzione della saliva. Dato che le ghiandole salivari hanno la capacità di metabolizzare il cortisolo, la concentrazione nella saliva corrisponde a circa il 50-60% della concentrazione del cortisolo libero nel siero. Cortisolo totale e libero correlano in modo prevedibile con il cortisolo salivare. Il cortisolo totale aumenta nella saliva in maniera lineare fino alla concentrazione di 600 nmol/L; a tale livello la capacità legante della CBG è saturata; sopra tale concentrazione l'aumento nel siero è molto più marcato dell'aumento della concentrazione nella saliva. Questo fenomeno è confermato dal fatto che in gravidanza, quando la concentrazione della CBG aumenta, la correlazione si spinge ad una concentrazione più alta di cortisolo nel siero e, quando sono confrontati cortisolo salivare e cortisolo sierico libero, la correlazione si mantiene per l'intero ambito della concentrazione di cortisolo.

Uno degli ostacoli all'introduzione più ampia degli esami su saliva è stato finora l'indisponibilità di dispositivi semplici ed efficienti per la raccolta dei campioni. Probabilmente oggi l'introduzione di dispositivi come Salivette (Sarstedt, Verona) ha risolto il problema. Il paziente deve essere istruito, in modo molto dettagliato a:

1) Stringere saldamente il bordo del contenitore interno della Salivette e rimuovere il tappo. La rimozione del tappo è facilitata se lo si spinge lateralmente.

- 2) Collocare il tampone direttamente in bocca. Per facilitare l'operazione battere delicatamente il fondo della provetta in modo che il tampone si sposti verso la bocca. Il tampone non deve essere toccato con le dita.
- 3) Masticare delicatamente il tampone per due minuti.
- 4) Riporre quindi il tampone nel contenitore interno e chiudere la Salivette premendo saldamente il tappo.
- 5) Consegnare la salvietta ben chiusa e può essere conservata a temperatura ambiente per sette giorni.

Tra i pochi limiti di questo sistema si possono rilevare: la necessità di usare tamponi dedicati al solo cortisolo (verosimilmente gli steroli vegetali contenuti nel cotone possono interferire con la misurazione degli altri steroidi) e l'inopportunità d'impiego nei bambini con meno di 3 anni e nei soggetti a rischio di deglutire la Salivette. Deve essere poi evitato il succo di limone per stimolare la produzione di saliva in quanto può dare interferenze.

Dato che il rapporto tra cortisolo salivare e sierico è circa 1:20, la contaminazione della saliva con sangue può aumentare in modo spurio la concentrazione del cortisolo. In generale è sufficiente l'ispezione visiva (una concentrazione dello 0.2% aumenta la concentrazione del cortisolo del 4%).

Dal punto di vista analitico la determinazione del cortisolo nella saliva richiede una notevole sensibilità e quindi i metodi RIA disponibili in commercio per il siero sono stati modificati per consentirne l'uso nella saliva. Raff et al. avevano proposto di misurare il cortisolo salivare usando un metodo RIA modificato (Coat-a-Count) portando il volume del campione da 25 a 200 µL ottenendo la minima concentrazione misurabile di 0.4 nmol/L¹⁶. In generale nei metodi per la determinazione del cortisolo nella saliva occorre che la minima concentrazione misurabile sia intorno a 0.5 nmol/L (0.018 µg/dL). Sono disponibili commercialmente metodi messi a punto specificatamente per questo tipo di misura (American Laboratory Products Co, UK; Cambridge Bioscience, UK; Diametra, Italia; IBL, Germania; IDS, UK; Salimetrics, USA). Alcuni dei metodi ad alta sensibilità presentavano notevoli interferenze. Per esempio il metodo Spectria (Orion, Finlandia) presentava cross-reazioni per 5α-diidro cortisolo, 21-deossicortisolo, prednisolone, 5β-diidro cortisolo e 6α-metilprednisolone pari rispettivamente a 84.3%, 78.8%, 45.3%, 11.9% e 11.0%. Il metodo immunoenzimatico Salimetrics dava risultati comparabili con il metodo RIA Coat-a-Count e il metodo DSL-EIA anche se il metodo Salimetrics produceva risultati pari a quasi il doppio del metodo RIA.

Gli sforzi per usare gli analizzatori automatici per la determinazione del cortisolo hanno avuto scarso successo fino a quando si è reso disponibili il metodo ECLIA Roche prima su Elecsys e poi su Modular. Già nel 2004 Chiu et al. hanno dimostrato risultati incoraggianti di Elecsys rispetto ai metodi Coat-a-Count e Salimetrics ed hanno definito la variabilità biologica intra-soggetto (6.3%), inter-soggetto (20.5) ed una Differenza critica (20.4%)¹⁷.

Due studi interessanti hanno presentato dati importanti a proposito della possibilità di impiegare in clinica il metodo Modular. Beko et al. hanno confrontato il metodo ECLIA con un metodo RIA *home made* in 126 soggetti sottoposti ad un'esaustiva valutazione clinica e di laboratorio (cortisolo al mattino, test di soppressione al desameta-

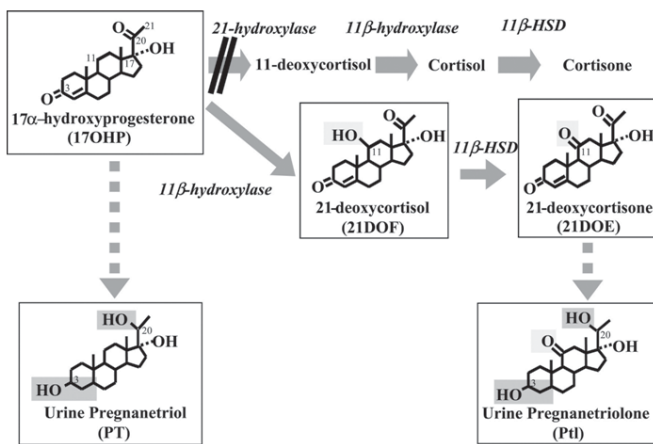


Figura 5. Via metabolica alternativa alla secrezione di cortisolo in caso di deficit di 21 idrossilasi con aumento della produzione del possibile interferenze 21-deossicortisolo.

sione 1 mg e determinazione di ACTH)¹⁸. La diagnosi, confermata al tavolo operatorio è stata fatta in 7 pazienti. Il metodo ECLIA è molto correlato con il metodo RIA ($R^2 = 0.98$) e l'area sotto la curva è risultata di 0.933 per ECLIA e 0.917 per il RIA usando come cut-off rispettivamente 3 $\mu\text{g/L}$ (sensibilità = 100% e specificità = 88%) e 2.9 $\mu\text{g/L}$ (sensibilità = 100% e specificità = 71%). Gli autori ungheresi rilevano che l'AUC del cortisolo salivare a mezzanotte è maggiore di quella mostrata dal desametasone (AUC = 0.866; sensibilità = 83.3% e specificità: 97.2% ad un valore di cut-off di 4.02 $\mu\text{g/L}$). In Figura 4 sono riportate le prestazioni diagnostiche dei due cut-off impiegati da Beko et al. confrontate con quelle della letteratura. Il metodo ECLIA sembra fornire delle prestazioni superiori a quelle dei metodi RIA generalmente disponibili commercialmente, anche se inferiori rispetto a quelle ottenute da alcuni autori con metodi *home made*. È impossibile stabilire se questo è dovuto anche alla selezione della casistica (in quella di Beko sono rappresentati pazienti obesi e diabetici che possono dare dei falsi positivi) ovvero alle cross-reazioni di cui soffre il metodo Modular (per esempio del 45.4% per il deossicortisolo) che rende il metodo poco attendibile nei pazienti con iperplasia surrenalica congenita da deficit di 21-idrossilasi (Fig. 5). Gli autori concludono che questi problemi vengono in secondo piano se teniamo conto della semplicità d'impiego assai maggiore rispetto ai metodi in LC/MSMS.

Simultaneamente al precedente è comparso il lavoro di Carrozza et al. eseguito in 33 pazienti nei quali era sospettata la sindrome di Cushing. Usando come cut-off 3 $\mu\text{g/L}$, gli autori hanno trovato una sensibilità del 100% ed una specificità del 97.4%¹⁹.

La misurazione del cortisolo nella saliva si sta diffondendo in tutto il mondo; in India è stata recentemente usata in uno studio che ha interessato 56 soggetti normali, 40 pazienti sospettati di sindrome di Cushing e 30 con diagnosi confermata; alla concentrazione di 3.9 $\mu\text{g/L}$ la sensibilità è risultata del 69.2% e la specificità del 100% mentre alla concentrazione di 1.65 $\mu\text{g/L}$ la sensibilità è risultata del 93.9% e la specificità dell'81.1%²⁰. Quindi, il cut-off di 3.9 $\mu\text{g/L}$ ha presentato una specificità elevata, ma non ha diagnosticato il 30% dei soggetti con sindrome di Cushing, mentre il cut-off di 1.65 $\mu\text{g/L}$ assicura la migliore accura-

tezza (questo valore, però, inferiore alla sensibilità funzionale, 3.1 $\mu\text{g/L}$, e non è applicabile in clinica).

Semplicità d'uso e non invasività lo hanno fatto impiegare nei bambini per differenziare la sindrome di Cushing dall'obesità (anche se è ben noto che anche il cortisolo salivare è meno diagnostico nei pazienti obesi), non è stata molto studiata l'influenza di sesso, età e patologie coesistenti sull'efficacia diagnostica. È importante, per esempio, considerare che il ritmo circadiano è attenuato in molti pazienti con patologie depressive, in condizioni critiche o in chi lavora di notte²¹.

Le ghiandole salivari contengono la 11 β -idrossisteroide deidrogenasi tipo 2 che converte il cortisolo biologicamente attivo in cortisone; i soggetti che consumano liquirizia o masticano tabacco (prodotti che contengono l'inibitore di tale enzima, l'acido glicirrizico) possono presentare valori falsamente elevati di cortisolo salivare notturno, come i fumatori rispetto ai non fumatori (nel giorno della raccolta è prudente non fumare sigarette). Infine, deve essere evitata la raccolta dopo stress importanti e quindi va riservata a giorni in cui è possibile rimanere rilassati nelle ore precedenti la raccolta.

Conclusioni

Il ruolo del laboratorio nella diagnosi della sindrome di Cushing è stato recentemente oggetto di rassegne e linee guida autorevoli e sostanzialmente la posizione della Endocrine Society è stata confermata in Francia e in Europa in generale. In Francia il Ministero della Sanità ha ufficializzato un "Protocole national de diagnostic et de soins-syndrôme de Cushing" che è allineato a quello dell'Endocrine Society ma è completato dalla parte di gestione clinica²². Un recente articolo francese ha ricordato le problematiche trasversali tra il versante clinico e quello sociale che rende conto delle numerose iniziative internazionali per assistere soprattutto i medici non specialisti ed i pazienti nell'affrontare una malattia rara come la sindrome di Cushing²³.

Nella nostra esperienza abbiamo introdotto, dopo molte valutazioni, il cortisolo salivare nella routine del nostro laboratorio. La decisione è venuta dopo un lungo percorso che è passato attraverso gli sforzi per la ottimizzazione del metodo estrattivo per il cortisolo libero urinario, la verifica dell'intervallo di riferimento del cortisolo su siero e la valutazione del metodo per il cortisolo salivare. Il metodo estrattivo (impiegando una classica procedura al diclorometano)²⁴ ha presentato delle prestazioni di ripetibilità non soddisfacenti soprattutto per un esame che è richiesto in molti casi, come peraltro raccomandato dalle linee guida, due o tre volte. Abbiamo proceduto alla verifica, con metodo indiretto, dell'intervallo di riferimento del cortisolo sierico rilevando una discreta differenza rispetto a quello in uso (Fig. 6). Siamo stati anche in grado di verificare, sempre con metodo indiretto, il cut-off proposto dalla letteratura per il cortisolo salivare con il metodo ECLIA che è stato sostanzialmente confermato (Fig. 7). Simultaneamente all'introduzione del cortisolo salivare abbiamo interrotto la misurazione del cortisolo nell'urina. In tutta quest'esperienza, l'aspetto più complesso dal punto di vista logistico è stato quello di trasferire ad un'utenza che accede a sette presidi ospedalieri e a quasi cento punti prelievo l'informazione circa le modalità di una corretta

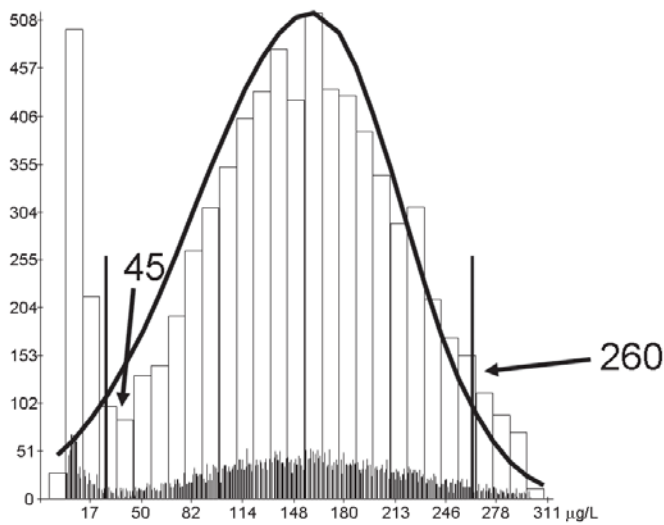


Figura 6. Intervallo di riferimento del cortisolo sierico ottenuto con metodo indiretto presso il laboratorio Unico di AVR.

raccolta del campione.

Possono essere indicativi delle difficoltà nella raccolta di dati sulla sindrome di Cushing i risultati di una revisione sistematica e meta-analisi del 2008 relative alla letteratura prodotta tra il 1975 ed il settembre 2007²⁵. Sono stati selezionati 27 dei 1791 studi identificati: 14 basati sul cortisolo libero urinario, 10 sul cortisolo raccolto a mezzanotte (6 nel siero e 4 nella saliva), 14 sul test di soppressione al Desametasone a 1 mg, 8 su quello a 2 mg. Lo studio conclude che gli esami considerati sono accurati quando utilizzati nei centri specialistici, mentre non sono raggiunte conclusioni per quanto riguarda l'ambito ambulatoriale. L'UFC (14 studi) presentava rispettivamente: LR+: 10.6, Intervallo di confidenza (CI): 5.5–20.5; LR-: 0.16, CI: 0.08–0.33); il cortisolo salivare a mezzanotte (4 studi); LR: 8.8, CI 3.5–21.8; LR-0.07, CI 0–1.2; Test al DST overnight (14 studi): LR+: 16.4, CI 9.3–28.8; LR-: 0.06, CI 0.03–0.14 (Fig. 8). Va rilevato che, anche se l'UFC ed il test al Desametasone

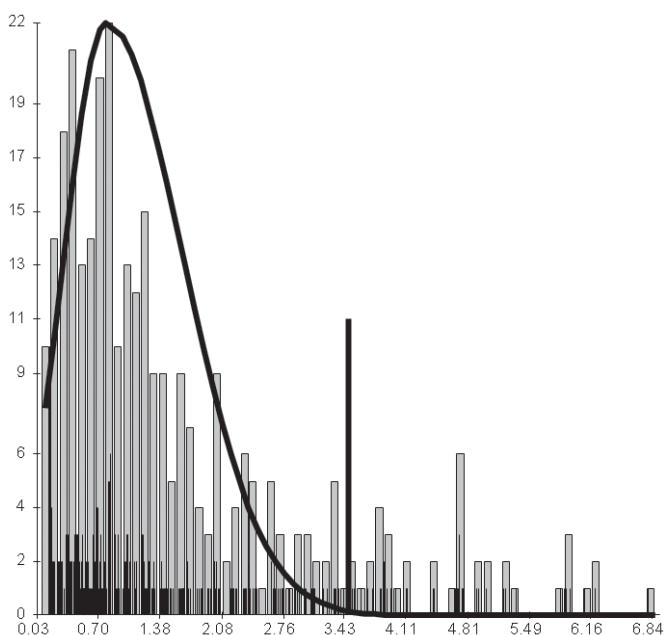


Figura 7. Cut-off del cortisolo salivare ottenuto con metodo indiretto presso il laboratorio Unico di AVR.

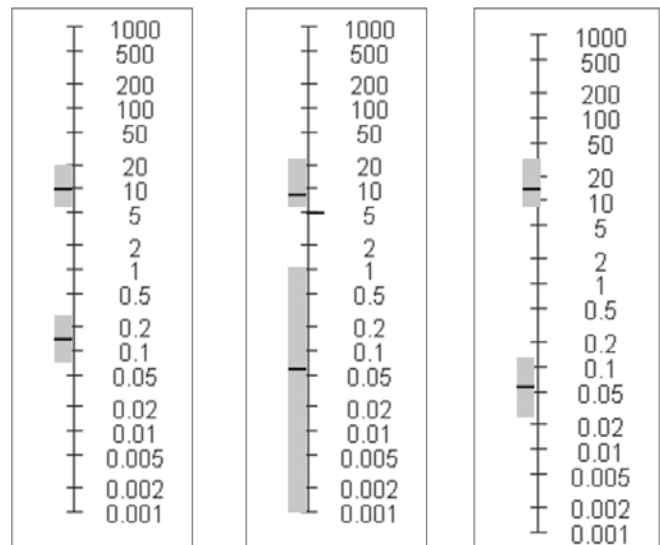


Figura 8. Nomogramma di Fagan: LR+ (Linea orizzontale) ed Intervallo di confidenza (area grigia in alto) e LR- (Linea orizzontale) ed Intervallo di confidenza (area grigia in basso) di UFC (a sinistra); cortisolo salivare (centro) e Test al DST (a destra).

presentano le prestazioni migliori, questo studio non ha compreso gli articoli più recenti che hanno impiegato il metodo ECLIA recentemente commercializzato.

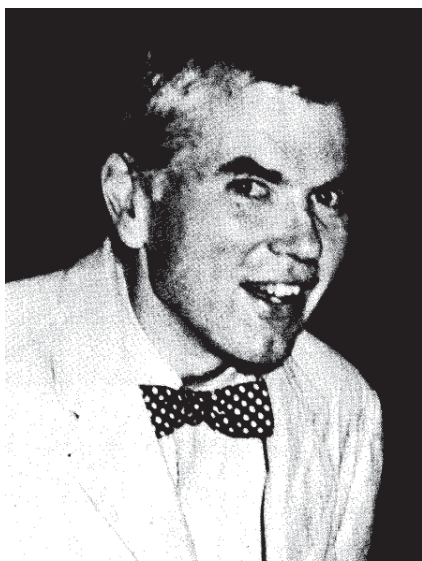
Back to the future

La prima descrizione dei surreni risale al 1563 quando Bartolomeo Eustachio descrisse le “glandole renibus incumbentes” e le disegnò nei suoi “Opuscola Anatomica” mentre Galeno riconobbe l'ipofisi nel secondo secolo dopo Cristo e la battezzò pituita “da flegma”²⁶.

La prima descrizione dei sintomi: obesità, diabete, irsutismo ed iperplasia surrenalica, avvenne ad opera di Harvey Cushing nel 1912 che li descrisse in una paziente di 23 anni che si presentò alla sua attenzione il 29 dicembre 1910. La sua cartella clinica è stata studiata recentemente (Fig. 9)²⁷. Nella monografia del 1912 “*The pituitary body and its disorders*” Cushing si chiede quale fosse l'origine dei pro-



Figura 9. Minnie G. all'epoca della prima visita di Cushing nel 1910 (da rif. 28 modificato).



Fuller Albright

Figura 10. Fuller Albright (1900-1969) (da Rif. 2 modificato).

blemi del Case XLV: "Pituitary, adrenal. Pineal, ovary?" Cushing riteneva che una parte dei suoi sintomi fossero secondari ad aumentata ipertensione intracranica e sottopose la paziente a decompressione che non fu risolutiva e la paziente fu dimessa con il commento "stazionaria". Tale rimase fino alla morte, avvenuta quasi mezzo secolo dopo, nel 1958. Il certificato di morte per malattia cardiaca aterosclerotica non faceva nessun cenno alla sindrome di Cushing e non ci fu autopsia. Cushing descrivendo la sindrome nel 1932 nell'articolo "*The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations*" vi inserì Minnie G; la paziente entrò così nella storia della medicina come il primo di una serie di 12 pazienti con questa nuova sindrome; due provenienti dalla sua casistica e 10 dalla letteratura. E' stato, tuttavia, ipotizzato che il primo caso di sindrome di Cushing risalga addirittura al 1898 quando fu descritta da William Osler che attribuì i caratteristici segni e sintomi a mixedema, mentre tra il 1903 e il 1910, come ammise Cushing, furono descritti altri casi tutti associati a malattia surrenalica. Va dato merito a Cushing che già nel 1912 ipotizzò che, se l'acromegalia era a carico delle cellule acidofile dell'ipofisi, doveva esistere un'altra patologia a carico di un eccesso di cellule basofile con sintomatologia a carico della funzione sessuale. Cushing riassunse le caratteristiche di tali pazienti *With some hesitation a separate group has been made under this heading, for the purpose of including a number of patients exhibiting unmistakable evidences of ductless gland disorder, in whom, however, the hypophyseal manifestations did not so far predominate as to justify the assumption that the extensive general glandular derangement had its origin in this particular gland.* Secondo Pendleton et al., la diagnosi potrebbe essere quella di *Primary pigmented Nodular Adrenal Disease (PPDN)* che può causare la sindrome di Cushing e può recedere. E' possibile che Minnie G presentasse al momento dell'intervento nel 1911 un adenoma ipofisario ACTH dipendente e che poi abbia subito un infarto spontaneo spiegando il decorso successivo²⁷. Dopo una decina di anni, nel 1942,

Fuller Albright, un altro grande della medicina ed in particolare dell'endocrinologia, concluse: *To be absolutely accurate, one should probably confine the term "Cushing's syndrome" to those individuals who present a certain striking clinical picture associated with a basophil tumor of the pituitary. However the author will use the term to refer to patients with the clinical pictures regardless of the etiology. From a clinical point of view, the syndrome is so striking that it seems almost certain that all individuals with it have some common denominator as regards the etiology.* La tragica e precoce interruzione della carriera professionale impedì ad Albright ulteriori intuizioni nei numerosi campi della endocrinologia che coltivava (Fig. 10).

Anche se secondo alcuni autori la prevalenza della sindrome di Cushing è in aumento, non devono sorprendere gli errori diagnostici se pensiamo che lo stesso Cushing incontrò il suo primo caso nel 1910, lo descrisse nel 1912, ma solo 20 anni dopo collegò i sintomi con l'ipercortisolismo. Il fatto è ancora più singolare se consideriamo che probabilmente assistette a quella che forse fu la prima descrizione di una sindrome di Cushing nel corso di una lezione del suo mentore: William Osler. Sembra quindi non eccessivamente dissacrante descrivere il ritardo e l'errore nella diagnosi della sindrome di Cushing come "Fenomeno di Osler" come proposto recentemente²⁹.

Bibliografia

1. Noe DA. The Logic of Laboratory Medicine. Disponibile su: URL: <http://users.rcn.com/dennisanoe/>. (data di consultazione: 10.9.2010).
2. Black ER. Hypercortisolism: Cushing syndrome. In: Black ER, Bordley DR, Tape TG, Panzer RJ, eds. Diagnostic Strategies for Common Medical Problems. Philadelphia: ACP; 1999. p.461-72.
3. Nugent CA, Warner HR, Dunn JT, Tyler FH. Probability Theory in the Diagnosis of Cushing's Syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1964; 24:621-7.
4. Dorizzi RM, Maconi M, Giavarina D, Loza G, Aman M, Moreira J, et al. An electronic thesaurus of Evidence Based Laboratory Medicine hematological and biochemical diagnostic tests. Int J Lab Hematol 2009; 31:544-51.
5. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Steward PM, et al. The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93:1526-40.
6. Baid SK, Rubino D, Sinaii N, Ramsey S, Frank A, Nieman LK. Specificity of Screening Tests for Cushing's Syndrome in an Overweight and obese population. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94:3857-64.
7. Mullan K, Black N, Thiraviaraj A, Bell PM, Burgess C, Hunter SJ, et al. Is there value in routine screening for Cushing's syndrome in patients with diabetes? J Clin Endocrinol Metab 2010; 95:2262-5.
8. Attanasio R, Dorizzi RM, Martinelli M, Terzolo M. Manuale per valutazione e inquadramento di patologie surrenaliche e ipertensione arteriosa endocrina. Verona: AME 2008.
9. Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo EF. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. Clin Biochem 2009; 42:1205-17.
10. Roberts RF, Roberts WL. Performance characteristics of five automated serum cortisol immunoassays. Clin Biochem 2004; 37:489-93.
11. Homma K, Hasegawa T, Takeshita E, Watanabe K, Anzo M, Toyoura T, et al. Elevated urine pregnanetriolone definitively establishes the diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency

- in term and preterm neonates. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:6087-91.
12. Chiodini I, Morelli V, Salcuni AS, Eller-Vainicher C, Torlontano M, Coletti F, et al. Beneficial metabolic effects of prompt surgical treatment in patients with an adrenal incidentaloma causing biochemical hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:2736-45.
 13. Stewart PM. Is subclinical Cushing's syndrome an entity or a statistical fallout from diagnostic testing? Consensus surrounding the diagnosis is required before optimal treatment can be defined. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:2618-20.
 14. Ching SY, Lim EM, Beilby J, Bhagat C, Rossi E, Walsh JP, et al. Urine free cortisol analysis by automated immunoassay and high-performance liquid chromatography for the investigation of Cushing's syndrome. *Ann Clin Biochem* 2006; 43:402-7.
 15. Wood P. Salivary steroid assays - research or routine? *Ann Clin Biochem* 2009; 46:183-96.
 16. Raff H. Utility of salivary cortisol measurements in Cushing's syndrome and adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:3647-55.
 17. Chiu SK, Collier CP, Clark AF, Wynn-Edwards KE. Salivary cortisol on ROCHE Elecsys immunoassay system: pilot biological variation studies. *Clin Biochem* 2003; 36:211-4.
 18. Beko G, Varga I, Glaz E, Sereg M, Feldman K, Toth M, et al. Cutoff values of midnight salivary cortisol for the diagnosis of overt hypercortisolism are highly influenced by methods. *Clin Chim Acta* 2010; 411:364-7.
 19. Carrozza C, Corsello SM, Paragliola RM, Ingraudo F, Palumbo S, Locantore P, et al. Clinical accuracy of midnight salivary cortisol measured by automated electrochemiluminescence immunoassay method in Cushing's syndrome. *Ann Clin Biochem* 2010; 47:228-32.
 20. Jeyaraman K, Ammini AC, Nandita G, Dwivedi SN. Late-night salivary cortisol in normal subjects and in patients with Cushing's syndrome. *Postgrad Med J* 2010; 86:399-404.
 21. Carroll T, Raff H, Findling JW. Late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing syndrome: a meta-analysis. *Endocr Pract* 2009; 15:335-42.
 22. Protocole national de diagnostic et de soins-syndrome de Cushing, 2008. Disponible su: URL: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2008-12/pnds_syndrome_de_cushing_version_web_051208.pdf. (data di consultazione: 10.9.2010).
 23. Guignat L, Bertherat J. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline: commentary from a European perspective. *Eur J Endocrinol* 2010; 163:9-13.
 24. Cortisolo. Mannheim: Roche Diagnostics, 2008.
 25. Elamin MB, Murad MH, Mullan R, Erickson D, Harris K, Nadeem S, et al. Accuracy of Diagnostic Tests for Cushing's Syndrome: A Systematic Review and Metaanalyses. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 93:1553-62.
 26. Aron DC. Cushing's syndrome from bedside to bench and back: a historical perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005; 34:257-69.
 27. Pendleton C, Adams H, Laws ER, Quinones-Hinojosa A. The elusive Minnie G. Revisiting Cushing's case XLV, and his early attempts at improving quality of life. *Pituitary*. 2010 Aug 15. [Epub ahead of print].
 28. Lanzino G, Maartens NF, Laws ER Jr. Cushing's case XLV: Minnie G. *J Neurosurg* 2002; 97:231-4.
 29. De P, Evans LM, Scanlon MF, Davies JS. "Osler's phenomenon": misdiagnosing Cushing's syndrome. *Postgrad Med J* 2003; 79:594-6.