

## NUOVI TEST E NUOVI CUT-OFF PER LA DIAGNOSI BIOCHIMICA DI INSUFFICIENZA SURRENALICA

**Coordinatori**  
Vincenzo Toscano & Renato Cozzi  
**Editor**  
Vincenzo Di Donna & Cecilia Motta

### Introduzione

È indispensabile che la diagnosi di insufficienza surrenalica (IS) sia accurata e rapida, dato il potenziale pericolo di vita conseguente al mancato riconoscimento della patologia. Allo stesso tempo, una diagnosi inappropriata porterebbe a un trattamento glucocorticoideo non necessario.

Le concentrazioni di cortisolemia al mattino possono essere d'aiuto nel sospetto di IS o nell'escluderne la diagnosi: mentre valori compresi tra 11 e 19 µg/dL escludono l'IS, valori < 3 µg/dL sono ritenuti indicativi di IS, ma esiste un'ampia zona grigia (3-10 µg/dL) in cui è indicato l'utilizzo di test biochimici che permettono di valutare la funzione surrenalica dopo stimolo con ormone adrenocorticotropo (ACTH), e quindi l'integrità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS).

Il test di stimolo con ACTH (ACTH sintetico<sub>1-24</sub>; cosintropina; Synacthen) (CST) è comunemente eseguito nei pazienti con sospetta IS primaria o secondaria, in quanto capace di stimolare la secrezione surrenalica di cortisolo. Diverse metanalisi hanno dimostrato che le dosi di ACTH utilizzate (1 µg o 250 µg) hanno accuratezza diagnostica sovrapponibile, e viene considerata normale la risposta del cortisolo ≥ 18 µg/dL (500 nmol/L) dopo 30' o 60' dallo stimolo. Tale soglia è stata stabilita sulla base dei dosaggi di vecchia generazione (es. *Elecsys Cortisol generation I di Roche Diagnostics*), che, utilizzando anticorpi policlonali, presentano *cross-reattività* con altri steroidi sierici e possono sovrastimare il valore del cortisolo stesso. Ad oggi non vi è consenso su come considerare i pazienti con risposte discordanti: valori basali bassi che raggiungono il *cut-off* con lo stimolo e valori basali in zona grigia che non raggiungono il *cut-off*.

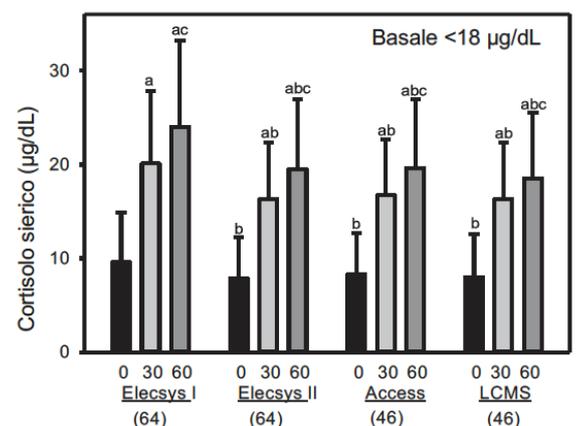
Sono attualmente disponibili **dosaggi di nuova generazione con maggiore specificità** per il cortisolo, che stanno sostituendo i precedenti test analitici. Si tratta di test immunologici, come l'*Elecsys Cortisol II di Roche Diagnostics* e il *Beckman Access Cortisol* che utilizzano anticorpi monoclonali, e il test in tandem cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS/MS), che invece è un dosaggio non-anticorpale. Sono tutti altamente specifici, e con essi le concentrazioni sieriche del cortisolo sono risultate in media inferiori di circa il 20% rispetto ai dosaggi con anticorpi policlonali.

### Lo studio

Un recente studio (1) ha valutato la risposta sierica del cortisolo dopo stimolo con ACTH<sub>1-24</sub> sintetico in **110 pazienti con sospetta diagnosi di IS secondaria**, mettendo a confronto i dosaggi del cortisolo più specifici (due con anticorpi monoclonali e LC-MS/MS) con il precedente metodo di dosaggio con anticorpi policlonali, con l'obiettivo di estrapolare nuovi *cut-off*.

In particolare, è stata effettuata un'analisi retrospettiva dei campioni plasmatici conservati ottenuti durante test di stimolo con ACTH eseguiti in pazienti con sospetta IS secondaria (sia ambulatoriali che ospedalizzati) da gennaio ad aprile 2017. I campioni di siero per il cortisolo sono stati analizzati in parallelo utilizzando saggi immunologici *Elecsys I ed Elecsys II* e, quando disponibile un volume di siero adeguato, con *Access Immunoassay ed LC-MS/MS*.

I valori basali di cortisolemia sono stati: 8.0 µg/dL per *Elecsys I*, 6.6 µg/dL per *Elecsys II*, 6.9 µg/dL per *Access* e 6.6 µg/dL per LC-MS/MS (fig 1). Utilizzando il valore soglia di 18 µg/dL come *cut-off* di cortisolo dopo CST, veniva posta diagnosi biochimica di IS nel 14.5%, 29%, 22.4% e 32% dei pazienti, utilizzando rispettivamente i dosaggi *Elecsys I*, *Elecsys II*, *Access* e *LC-MS/MS*.



**Figura 1.** Confronto dei valori di cortisolo al basale, a 30 minuti e a 60 minuti dopo la stimolazione con ACTH (cosintropina) solo in quei pazienti con dati per tutti e 3 i punti temporali all'interno di ciascun metodo di dosaggio (misure ripetute accoppiate). a, diverso da 0 minuti all'interno del metodo. b, diverso da Elecsys I nello stesso punto temporale. c, diverso da 30 minuti all'interno del metodo. I numeri tra parentesi sono N valori.



Sono state usate le regressioni di *Deming* per calcolare la pendenza e l'intercetta (con IC 95%) della relazione tra *Elecsys II*, *Access*, o *LC-MS/MS* vs *test* del cortisolo *Elecsys I* e quindi calcolare i nuovi valori di *cut-off* di cortisolo dopo stimolo, partendo dai soggetti con cortisolo basale < 18 µg/dL con saggio *Elecsys I*. I **nuovi cut-off sono risultati, rispettivamente, 14.6 µg/dL per *Elecsys II*, 14.8 µg/dL per *Access* e 14.5 µg/dL per *LC-MS/MS***. Un valore di cortisolemia basale < 2 µg/dL era sempre predittivo di valori di cortisolo stimolato subnormale.

**Tabella 1.** Nuovi limiti di cortisolo stimolati con Cosyntropina (CST) a 30 e 60 minuti per *Elecsys II*, *Access* e *LC-MS/MS* intorno ai valori comunemente usati (17-20 µg/dL) per la valutazione dell'insufficienza surrenalica

<i>Elecsys I</i>	30-min post-CST (250 µg)			50-min post-CST (250 µg)		
	<i>Elecsys II</i>	<i>Access</i>	<i>LC-MS/MS</i>	<i>Elecsys II</i>	<i>Access</i>	<i>LC-MS/MS</i>
<b>17.0</b>	13.9	14.0	13.7	13.9	13.8	13.0
<b>18.0<sup>a</sup></b>	14.6	14.8	14.5	14.7	14.5	13.7
<b>19.0</b>	15.4	15.5	15.2	15.5	15.3	14.5
<b>20.0</b>	16.2	16.3	16.0	16.3	16.1	15.2
<b>N</b>	78	54	48	64	48	48
<b>Slope</b>	0.78	0.77	0.77	0.81	0.78	0.74
<b>95% CI</b>	[0.74-0.82]	[0.70-0.84]	[0.68-0.86]	[0.76-0.86]	[0.71-0.85]	[0.64-0.83]
<b>Y-int</b>	0.6	0.9	0.6	0.1	0.5	0.4
<b>95% CI</b>	[-0.3 to 1.5]	[-0.7 to 2.4]	[-1.4 to 2.6]	[-1.1 to 1.3]	[-1.4 to 2.4]	[-2.1 to 2.9]
<b>r value</b>	0.98	0.95	0.93	0.97	0.96	0.92

I cutoff sono stati generati utilizzando i dati di regressione di Deming mostrati. [I CI al 95% per la pendenza e l'intercetta sono mostrati tra parentesi]. Le unità di cortisolo sono in µg/dL. Per convertire µg/dL in nmol/L, moltiplicare per 27,6. I dati si basano su tutti i pazienti con un cortisolo sierico basale <18 µg/dL. I valori N sono diversi per 30 vs 60 minuti perché questi non erano tutti risultati accoppiati. Pertanto, non è possibile confrontare 30 contro 60 minuti in questa tabella.

Abbreviazioni: LC-MS/MS, cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem; Y-int, intercettazione dell'asse y.

a18,0 µg/dL è il cutoff ampiamente utilizzato.

## Commento

Questo studio ha dimostrato che nei pazienti con sospetta IS, i **nuovi dosaggi del cortisolo maggiormente specifici**, che utilizzano anticorpi monoclonali o cromatografia liquida-spettrometria di massa, rilevano valori sia basali che dopo CST inferiori rispetto a quelli che vengono adottati come normali. Sebbene ci sia un'eccellente correlazione tra i differenti *test*, i risultati del CST sono del 22-39% inferiori rispetto al *test Elecsys I*; pertanto, il **nuovo cut-off per la risposta del cortisolo dopo CST dovrebbe essere abbassato dagli attuali 18 µg/dL a 14-15 µg/dL**.

Altri autori (2) hanno utilizzato saggi *Elecsys II* e *LC-MS/MS*, riscontrando valori soglia del cortisolo di 12.7 µg/dL e 13.3 µg/dL e proponendo nuovi *cut-off* a 30 minuti dopo CST basati sul 2.5° percentile nei controlli sani: 14.9 µg/dL per *LC-MS/MS* e 16 µg/dL per *Elecsys II*. In un altro studio con soggetti sani è stato suggerito un nuovo limite di riferimento a 30 minuti dopo CST di ~ 16.6 µg/dL con il test *Access* (3).

Da questi dati si evince che utilizzando i nuovi dosaggi di cortisolo ma mantenendo il vecchio *cut-off* di 18 µg/dL la diagnosi biochimica di IS sarebbe inappropriata e il trattamento inadeguato in molti pazienti.

Anche se, come atteso, vi erano differenze tra i valori di cortisolo dopo 30' e 60' minuti dallo stimolo, ciò raramente creava confusione nella diagnosi e comunque vi era un'eccellente correlazione tra i *test* nei singoli tempi.

Per quanto riguarda i **valori di cortisolemia basale predittivi di IS**, in questo studio vi era differenza tra i bassi valori di cortisolo basale (definito come < 8 µg/dL) nei pazienti con risposta del cortisolo subnormale dopo CST (usando i nuovi valori di *cut-off*) rispetto a coloro che avevano una risposta normale; c'era invece notevole sovrapposizione nei pazienti con valori di cortisolo basale compresi tra 2 e 8 µg/dL. È probabile che i valori basali di cortisolo non siano un predittore affidabile di risposta allo stimolo, tranne in presenza di valori < 2 µg/dL. Questo dato è simile ai risultati di Kalaria et al (4), che hanno dimostrato che un valore basale di cortisolemia < 2.8 µg/dL aveva una sensibilità del 100% per CST alterato. Nei soggetti con cortisolemia basale bassa, età, sesso, *setting* (ricovero vs ambulatorio), valore basale di ACTH non influivano sulla risposta del cortisolo allo stimolo.

I **limiti** di questo studio:

- mancanza di un gruppo di controllo costituito da soggetti sani. Va però sottolineato che studi precedenti in soggetti sani, utilizzando dosaggi di cortisolo più specifici (compreso *LC-MS/MS*), hanno riscontrato un picco di risposta del cortisolo più basso dopo stimolo con ACTH, simile alla soglia del cortisolo riportata in questo studio (5,6);

- mancanza di *follow-up* a lungo termine per confermare la diagnosi di IS cronica e la necessità di supporto prolungato con glucocorticoidi;
- provenienza dei pazienti da contesti clinici diversi (es. pazienti ricoverati vs ambulatoriali, sani vs malati critici, anziani vs minori);
- mancata valutazione di condizioni/farmaci che possono interferire sull'asse surrenalico.

### Conclusioni

L'impiego dei più recenti dosaggi altamente specifici del cortisolo che utilizzano LC-MS/SM o un anticorpo monoclonale introduce nei pazienti con sospetta IS nuovi valori di *cut-off*, sia del cortisolo basale che stimolato.

Valori basali di cortisolo < 2 µg/dL sono costantemente associati a risposte ridotte dopo stimolo e quindi sempre indicativi di IS, mentre valori di cortisolo > 5 µg/dL si associano a risposte normali al CST. Si evince che sarebbe **consigliabile l'esecuzione del CTS per i valori "in zona grigia" compresi tra 2-5 µg/dL** (vedi figura 2).

In base al metodo di dosaggio utilizzato viene consigliato un **nuovo *cut-off* del cortisolo stimolato di 14-15 µg/dL** (invece del valore storico di 18 µg/dL ottenuto da dosaggi con anticorpi policlonali).

È importante che **nella valutazione clinica del paziente con sospetta IS il clinico conosca il kit di riferimento del proprio laboratorio**, per sapere se debba utilizzare i vecchi valori di riferimento del cortisolo o adeguare il giudizio clinico in base ai nuovi *cut-off* specifici per la metodica impiegata.

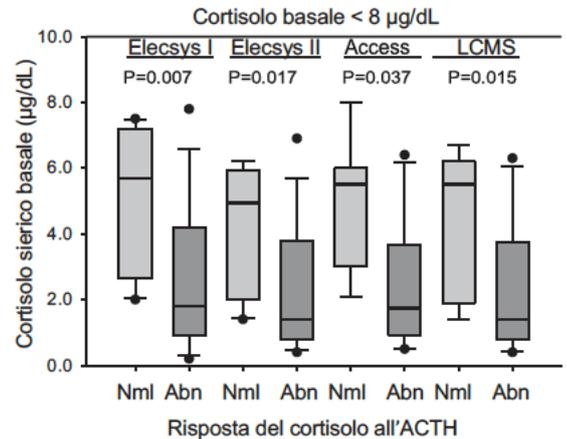


Figura 2. Grafici a scatola di confronto dei pazienti con valori basali di cortisolo <8 µg/dL su Elecsys I separati dal fatto che avessero una risposta normale o subnormale alla stimolazione con ACTH (cosintropina). I nuovi valori di cutoff del cortisolo sono stati utilizzati per determinare l'adeguatezza della risposta (valore di cortisolo al di sopra del cutoff nei punti temporali di 30 o 60 minuti). I valori P si riferiscono alle differenze tra la risposta normale e subnormale all'interno di ciascun metodo. Abbreviazioni: Nml, normale; Abn, anormale. I valori N per Nml e Abn sono 8 e 13, rispettivamente, per Elecsys I ed Elecsys II. I valori N per Nml e Abn sono 6-7 e 9-10, rispettivamente, per Access e LCMS (LC-MS/MS).

### Bibliografia

1. Javorsky BR, Raff H, Carroll TB, et al. New cutoffs for the biochemical diagnosis of adrenal insufficiency after ACTH stimulation using specific cortisol assays. *J Endocr Soc* [2021, 5: bvab022](#).
2. Grassi G, Morelli V, Ceriotti F, et al. Minding the gap between cortisol levels measured with second-generation assays and current diagnostic thresholds for the diagnosis of adrenal insufficiency: a single-center experience. *Hormones (Athens)* [2020, 19: 425-31](#).
3. El-Farhan N, Pickett A, Ducroq D, et al. Method-specific serum cortisol responses to the adrenocorticotrophin test: comparison of gas chromatography-mass spectrometry and five automated immunoassays. *Clin Endocrinol (Oxf)* [2013, 78: 673-80](#).
4. Kalaria T, Buch H, Agarwal M, et al. Morning serum cortisol is superior to salivary cortisone and cortisol in predicting normal adrenal function in suspected adrenal insufficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* [2022, 96: 916-18](#).
5. Klose M, Lange M, Rasmussen AK, et al. Factors influencing the adrenocorticotrophin test: role of contemporary cortisol assays, body composition, and oral contraceptive agents. *J Clin Endocrinol Metab* [2007, 92: 1326-33](#).
6. Ueland GA, Methlie P, Oksnes M, et al. The short cosyntropin test revisited: new normal reference range using LC-MS/MS. *J Clin Endocrinol Metab* [2018, 103: 1696-703](#).