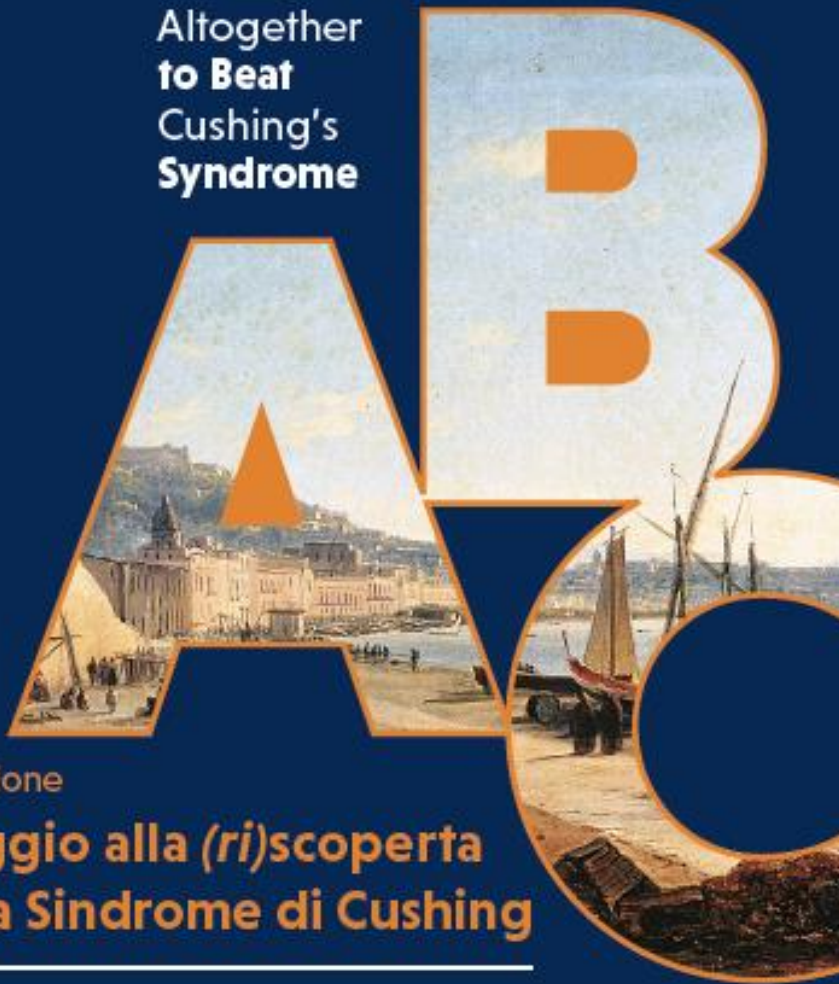




UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia

Altogether
to Beat
Cushing's
Syndrome



5ª Edizione

Viaggio alla (ri)scoperta della Sindrome di Cushing

Napoli, 10-12 Aprile 2017

Centro Congressi Federico II - Via Partenope, 36

Coordinatori Scientifici

Annamaria Colao, Rosario Pivonello

DEBATE:

**IL CORTISOLO SALIVARE COME TEST DI SCREENING O MARKER DI
MONITORAGGIO NELLA SINDROME DI CUSHING**

Moderatori: Carlo Foresta, Roberto Baldelli

VANTAGGI

Giorgio Arnaldi

LIMITI

Giovanna Mantovani

CONCLUSIONI & DISCUSSIONE

Carla Scaroni

Giorgio Arnaldi

*Clinica di Endocrinologia e Malattie del
Metabolismo*

Ospedali Riuniti di Ancona

Ancona

gioarnaldi@gmail.com

The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline

Lynnette K. Nieman, Beverly M. K. Biller, James W. Findling, John Newell-Price, Martin O. Savage, Paul M. Stewart, and Victor M. Montori

Cushing's syndrome suspected
(consider endocrinologist consultation)

Exclude exogenous glucocorticoid exposure

Perform one of the following tests

**First-line
screening test**

24-h UFC (≥ 2 tests)

Overnight
1-mg DST

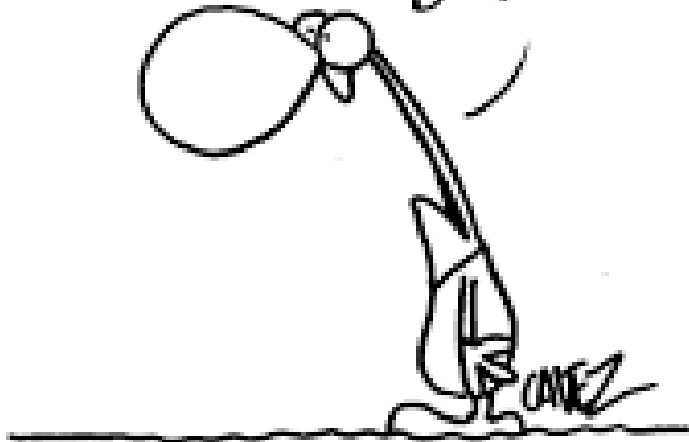
Late night salivary
cortisol (≥ 2 tests)

Consider caveats for
Use 48-h, 2-mg DST

Cut-off
1.8 mcg/dl (50 nmol/L) (see text)

Utilizzate il cortisolo salivare nella pratica clinica ?

SONO INDECISO
FRA STARE ZITTO,
NON DIRE NIENTE,
NON APRIRE
BOCCA
O TACERE !



Si

No

CORTISOLO SALIVARE:

vantaggi

- Riflette il cortisolo plasmatico libero e non è influenzato dal flusso salivare
- Facile esecuzione, conservazione, trasporto
- Approccio non invasivo, autonomo e privo di stress
- Non richiede personale qualificato ed è sicuro da maneggiare
- Utile nella valutazione di casi che richiedono ripetute raccolte (forme cicliche)
- Utile nelle forme di ipercortisolismo mild (?)

CORTISOLO SALIVARE:

modalità di raccolta

- Astensione dal fumo di sigaretta, dal mangiare, dall'assunzione di bevande, e dal lavare i denti per: 30 min, 60 min o 120 minuti?

Nelle 2 ore precedenti la raccolta della saliva :

- non assumere cibo e bevande (ad eccezione dell'acqua)
- non fumare

Sciacquarsi la bocca con un bicchiere di acqua 10 minuti prima della raccolta

Evitare di raccogliere il campione in presenza di sanguinamenti del cavo orale.

In generale è sufficiente l'ispezione visiva (una concentrazione dello 0.2% aumenta la concentrazione del cortisolo del 4%)

CORTISOLO SALIVARE: *modalità di raccolta*

Nelle 2 ore precedenti la raccolta della saliva :

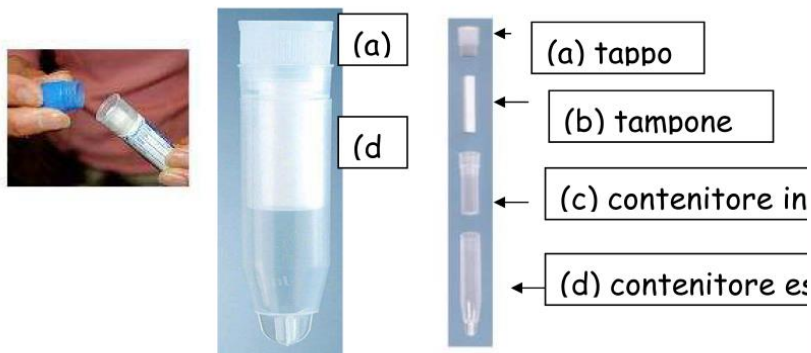
- non assumere cibo e bevande (ad eccezione dell'acqua)
- non fumare
- Sciacquarsi la bocca con un bicchiere di acqua 10 minuti prima della raccolta

N.B.: evitare di raccogliere il campione in presenza di sanguinamenti del cavo orale.



COME RACCOGLIERE IL CAMPIONE

1. Stringere saldamente il bordo esterno del contenitore Salivette **(d)** e rimuovere il tappo **(a)**.
(Durante questa operazione il contenitore interno potrebbe fuoriuscire in tal caso riposizionarlo all'interno).



2. Far scivolare il tampone (b) direttamente in bocca.
(Per facilitare l'operazione battere delicatamente il fondo della provetta)

NON TOCCARE IL CAMPIONE CON LE DITA



3. Masticare delicatamente il tampone per due minuti.
4. Riporre quindi il tampone nel contenitore interno e chiudere la Salivette premendo sul tappo. **NON TOCCARE IL TAMPONE CON LE DITA.**
Consegnare la Salivette, ben chiusa, al **Centro Prelievi del Laboratorio.**

I campioni possono essere conservati a temperatura ambiente fino a per 7 giorni.

Note importanti:

Prodotto non indicato per bambini al di sotto dei 3 anni o pazienti a rischio di deglutire la Salivette



Salivette

Collection of saliva using a cotton or a polyester roll (Salivette, Sarstedt) may seem attractive in some instances because of convenience and ease of use. However, this collection device is only appropriate for the assessment of cortisol, and is not suitable as a collection device for the other steroid hormones.



CORTISOLO SALIVARE:

conservazione – trasporto - stoccaggio

- I campioni possono essere conservati a 4-8 °C in frigorifero per 7 giorni
- Al laboratorio devono essere congelati a -20°C (per un massimo di tre mesi) o centrifugati e poi immediatamente analizzati
- **I protocolli di centrifugazione non sono standardizzati:** 800-400 giri per una durata variabile tra 2-20 minuti

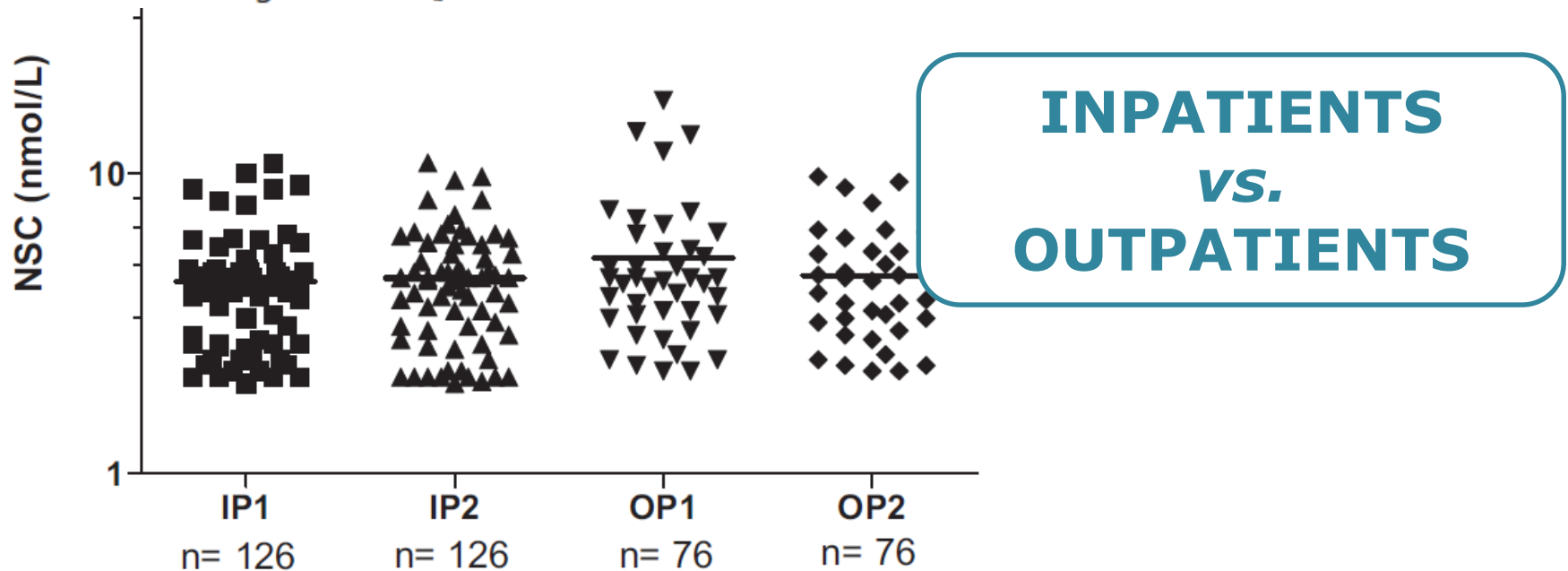
CORTISOLO SALIVARE:

- *Diagnosi della sindrome di Cushing*
 - Screening
 - Conferma
- *Monitoraggio della terapia medica*

Late-Night Salivary Cortisol for Diagnosis of Overt and Subclinical Cushing's Syndrome in Hospitalized and Ambulatory Patients

Marie-Laure Nunes, Stéphanie Vattaut, Jean-Benoît Corcuff, Alexandre Rault, Hugues Loiseau, Blandine Gatta, Nathalie Valli, Luc Letenneur, and Antoine Tabarin

Participants: Forty-two obese subjects participated in the study, as well as nine patients cured of Cushing's disease, 13 with overt Cushing's syndrome, 14 showing mild recurrence of Cushing's disease, and 48 with adrenal incidentalomas [23 subclinical cortisol-secreting adenomas (SCSA), 25 nonsecreting adenomas].



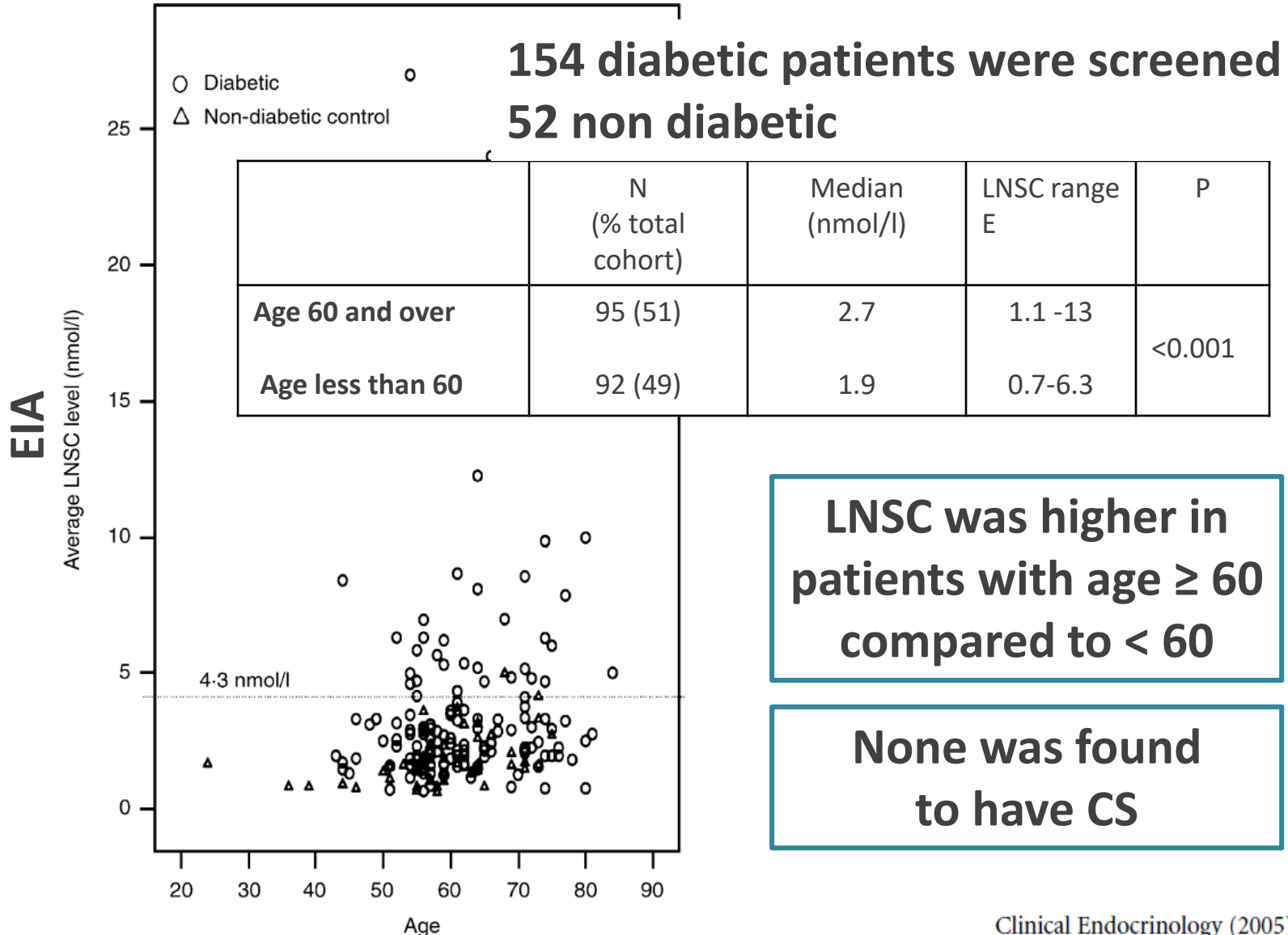
CORTISOLO SALIVARE: *performance*

	SENSITIVITY (%)	SPECIFICITY (%)	SUBJECTS (N°)	REFERENCE
	100	71,0	N=66 (CS N=9) (Suspicion CS N=57)	Beko et al. 2010
	100	97.7	N=116 (CS N=27) (HV N=89)	Manetti et al. 2013
	96.3	97.1	N=186 (CS N=82) (HV N=104)	Ceccato et al. 2013
	94.4	94.6	N=75 (CS N=57) (Suspicion CS N=18)	Elias et al. 2014
	100	94	N=73 (CS N=53) (Suspicion CS N=20)	Alwani et al. 2014
	99,9	88,0	N=126 (CS N=11) (Suspicion CS N=115)	Beko et al. 2010
	69,2	99,9	N=126 (Suspicion CS N=40) (HV N=56) (CS N=30)	Jeyaraman K et al.2010
	95,0	91,0	N=200 (Suspicion CS N=45) (HV N=115) (CS N=40)	Deutschbein Tet al 2012
	100	83	N=125 (CS N=26) (Suspicion CS N=35)(HV N=64)	Carrasco et al. 2012
	84,4	92,3	N=221 (CS N=221) (Suspicion N=123) (HV N=98)	Belaya et al. 2012
	ND	94,0	N=321 (Suspicion CS 261) (HV N=60)	Baid et al. 2007
	92,0	92,0	N=90 (Suspicion CS 52) (CS N=38)	Zerikly RK et al. 2010
	83,0	84,2	N=249 (Suspicion CS 202) (CS N47)	Erickson et al. 2012

Elevated late-night salivary cortisol levels in elderly male type 2 diabetic veterans

CORTISOLO SALIVARE e ETA'

Hau Liu*†, Dena M. Bravata†, Josel Cabaccan*, Hershel Raff‡ and Elisabeth Ryzen*§



CORTISOLO SALIVARE: *cut-off & setting clinico*

Il CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) raccomanda un minimo di 120 valori per determinare gli intervalli di riferimento/cut-off

PERFORMANCE DEL CSN in CLIA- Access Beckam Coulter (CUT-OFF 0.58 mcg/dl SC vs. VS)

- 122 volontari sani normopeso (VS)
- 42 pazienti con Sindrome di Cushing attiva (SC)
- 61 soggetti obesi (O)
- 27 pazienti con diabete mellito scompensato (D)

SOGGETTI	SENSIBILITA'	SPECIFICITA'	AUC	CUTOFF mcg/dl
SC vs. VS	97.2%	98.1%	0.974	0.58
SC vs. O	93.3%	74 %	0.860	0.58
SC vs. D	94.4 %	80 %	0.877	0.78
SC vs. O+ VS	93.3 %	83 %	0.917	0.58
SC vs. D + VS	95.2 %	84 %	0.923	0.62

Summary of *screening* studies in diabetic populations

	HbA1c	Screening Test	True Positive	False positive (cut-off used)
Leibovitz et al., 1996 (n=90)	>9%	oDST	3%	1% (140 nmol/L)
Catargi et al., 2003 (n=200)	>7%	oDST	2%	15% (60 nmol/L)
Chiodini et al., 2005 (n=294)	9.6±2.4%	oDST	9.4%	7% (50 nmol/l)
Reimondo et al., 2007 (n=100)	12% (inpatient) 9.6% (outpatient)	oDST	1%	32% (50 nmol/l) 5% (110 nmol/l)
Mullan et al., 2010 (n=201)	>7%	MSC	0%	23% (10 nmol/l)
Terzolo et al., 2012 (n=813)	8.4±1.9%	oDST	0.7%	22% (50 nmol/l) 4% (138 nmol/l)

CORTISOLO SALIVARE: 1 o 2 campioni ?

Reproducibility and performance of one or two samples of salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome using an automated immunoassay system

C. A. Carrasco · M. García · M. Goycoolea

J. Cerda · J. Bertherat · O. Padilla ·

D. Meza · N. Wohlk · T. Quiroga

Measurement	LNSC cut-off points (nmol/L)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
LNSC day 1	1.9	100	40
AUC 0.945 (IC 95% 0.880–1.004)	6.9	81	100
Highest LNSC ^a	4.2	100	83
AUC = 0.980 (IC 95% 0.954–1.007)	8.8	73	100

CUSHING (SC) n=26

SOSPETTO SC n= 35

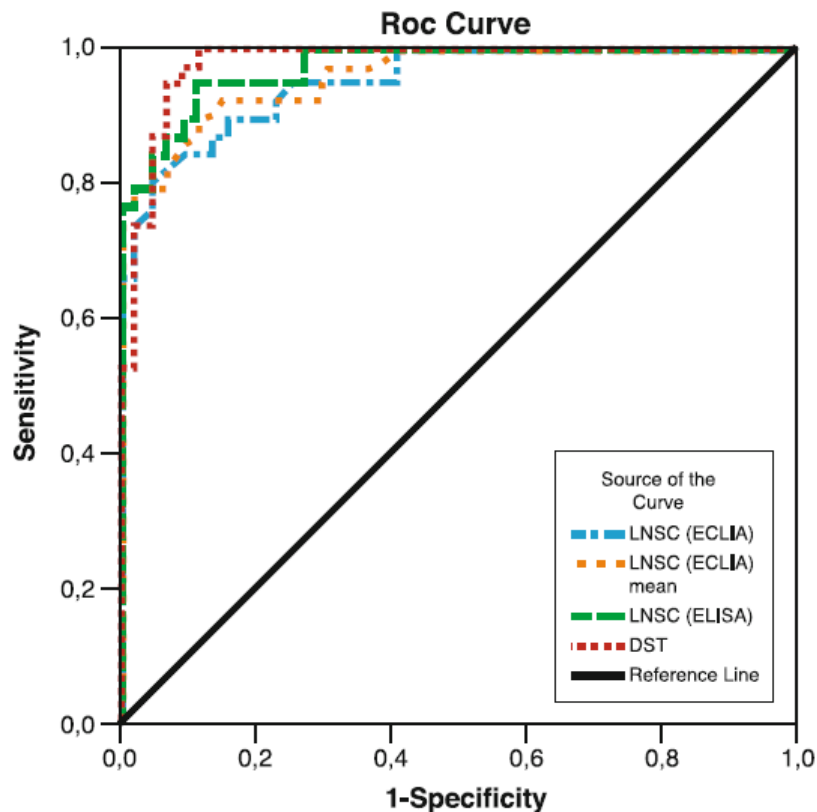
VOLONTARI SANI n=64

^a Cut-off value greater or equal to highest measurement of LNSC (day 1 vs. day 2)

CORTISOLO SALIVARE: 1 o 2 campioni ?

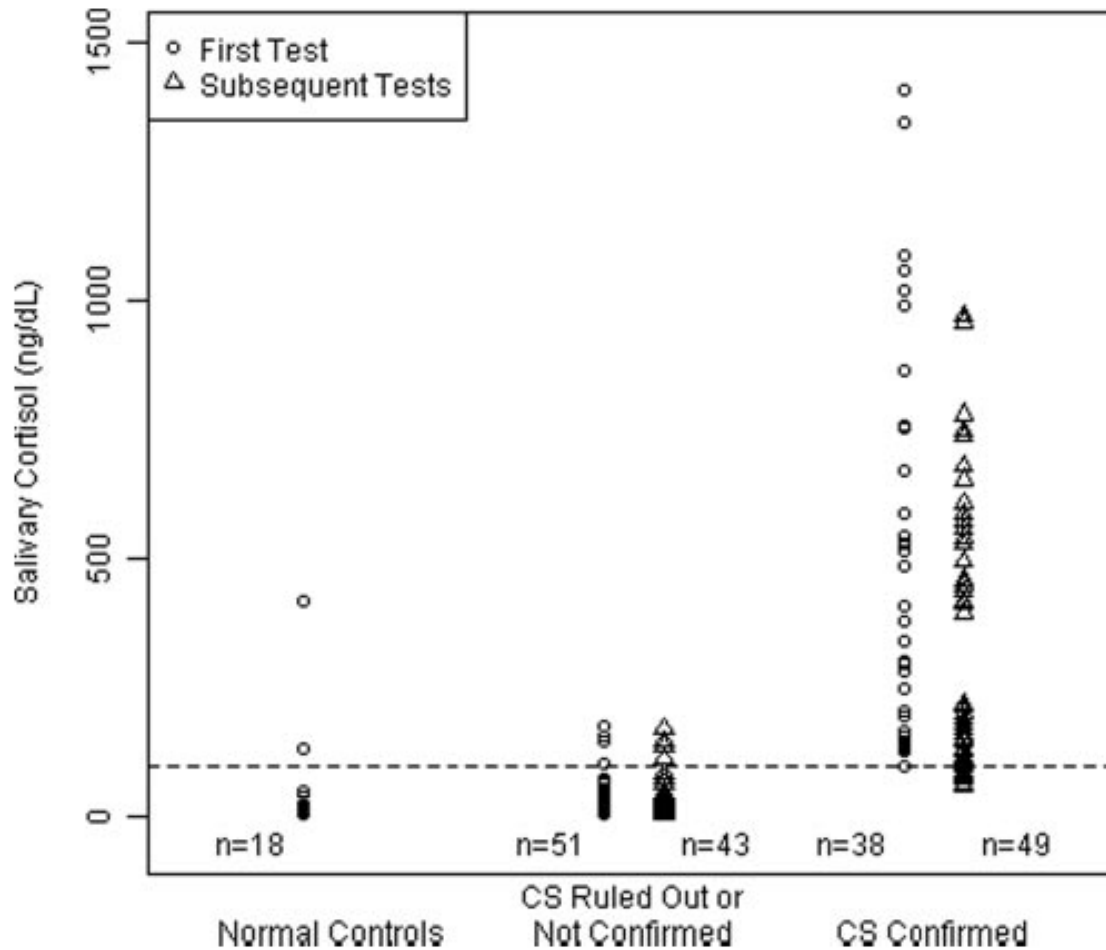
Diagnostic performance of late-night salivary cortisol measured by automated electrochemiluminescence immunoassay in obese and overweight patients referred to exclude Cushing's syndrome

Zhanna E. Belaya · Alexander V. Iljin · Galina A. Melnichenko ·
Liudmila Y. Rozhinskaya · Natalia V. Dragunova · Larisa K. Dzeranova
Svetlana A. Butrova · Ekaterina A. Troshina · Ivan I. Dedov



Volontari sani n=91
Obesi n=72
Sindrome di Cushing n=42

**Nessuna differenza significativa
tra l'AUC del primo, secondo e
media dei due campioni di LNSC
sia in ECLIA che in ELISA**



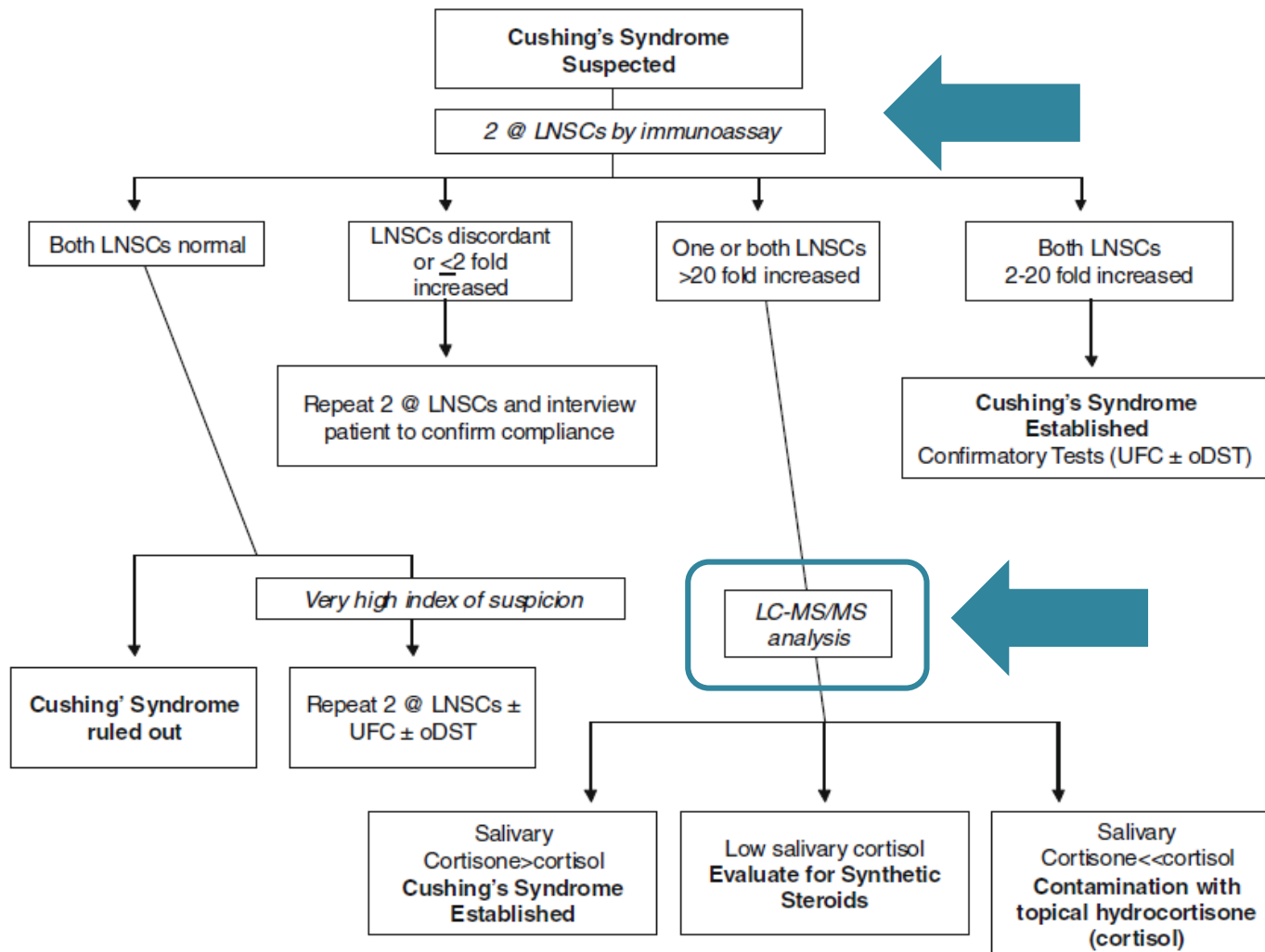
Cutoff 2.95 nmol/l
Sensibilità 92.1 %
Specificità 92.1 %

Uno o due campioni cortisolo salivare non determinano cambiamenti significativi nell'accuratezza diagnostica ($p= 0.64$)

CORTISOLO SALIVARE: *metodi analitici*

	RIA (manuale)	ECLIA (automatico)	LC-MS/MS
Volume	25 µl	20 µl	50-125 µl
Sensibilità analitica	0.4 nmol/l	1 nmol/l	0.3-2 nmol/l
Specificità	cross reazione con cortisone e steroidi sintetici	cross reazione con cortisone e steroidi sintetici	cross-reazione assente/minima
Costo	basso	basso	elevato
Difficoltà	minima	minima	elevata-personale esperto
Sensibilità (%)	94-100	84-100	83-92
Specificità (%)	71-94	83-99	84-94

CORTISOLO SALIVARE LC-MS/MS

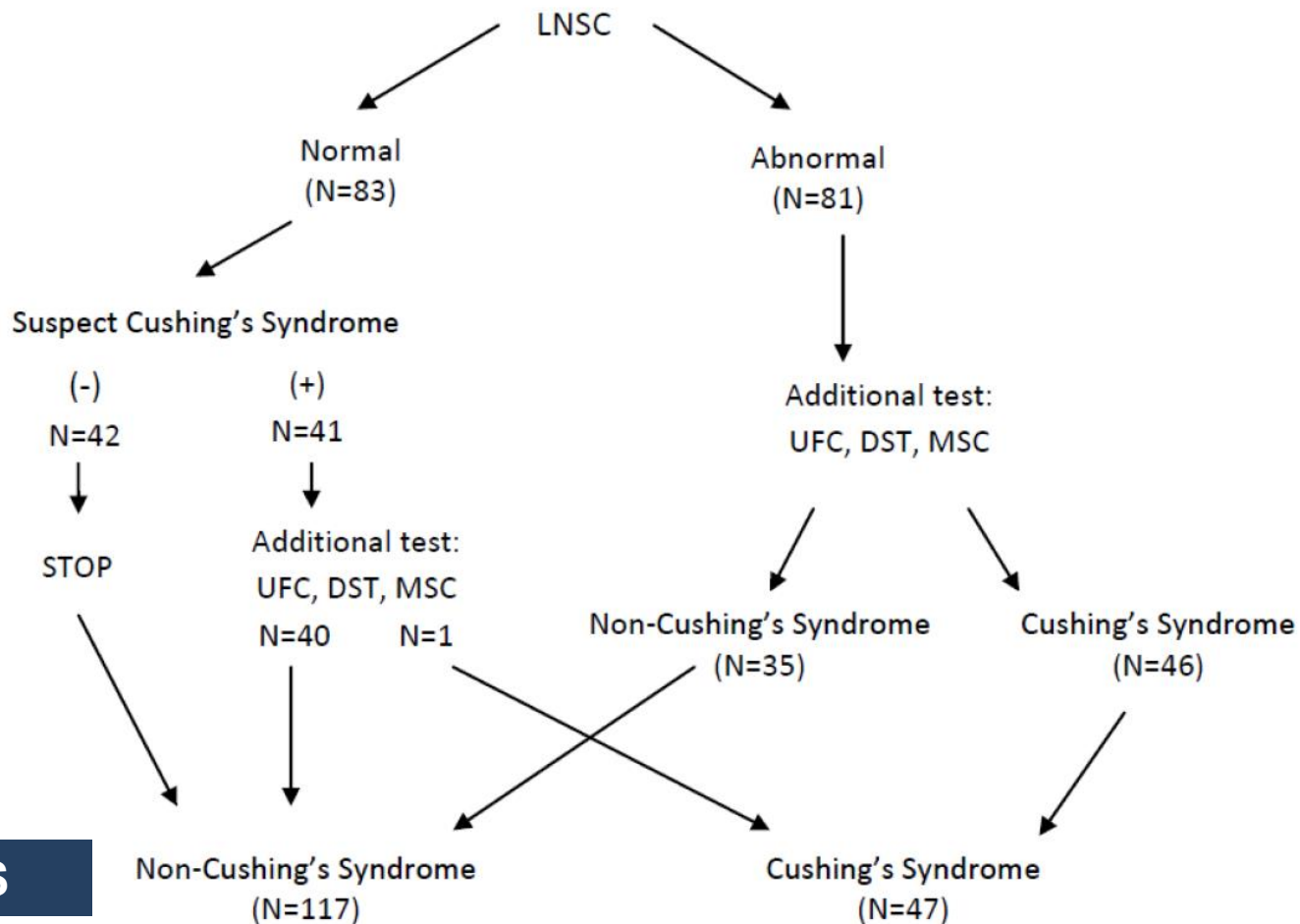


CORTISOLO SALIVARE: *la nostra esperienza...*

Patients with clinical suspect Cushing's Syndrome or potential hypercortisolism

(N=164)

CLIA



Screening test	No. with false negative test Cushing Syndrome group	No. with false positive test Non-Cushing group	No. with false positive test Volunteer subjects	VVP	VPN	SE	SP
LNSC (CLIA)	1/47	35/117	2/117	0.55	0.99	97%	84%

CLIA vs. LCMS-MS

CLIA LNSC falsi +

- Volontari (n=2)
- Non Cushing (n=21)



LCMS-MS

- Valori nella norma (n=2)
- Valori nella norma (n=12)

LCMS-MS identifica correttamente circa il 50 % dei soggetti con valori falsamente elevati di LNSC

Effetti dell' invecchiamento sull'asse HPA

- **Aumento del cortisolo plasmatico (totale e libero)**
- **Aumento del cortisolo salivare**
- **Anticipo del picco della cortisolemia del mattino**
- **Ritmo del cortisolo tendenzialmente appiattito**
- **Ridotta ampiezza della secrezione del cortisolo nelle 24 ore**
- Aumento della frammentazione della secrezione del cortisolo
- *Invariato il cortisolo urinario 24 ore*
- *Invariata la CBG*
- *Aumento della produzione giornaliera del cortisolo*
- *Lieve decremento della clearance plasmatica del cortisolo*
- Minore soppressione della cortisolemia dopo test con desametazone
- Non differenza nella risposta dell'ACTH dopo CRH ma ridotta capacità del desametazone ad inibirne lo stimolo
- Ridotta risposta del cortisolo dopo ACTH
- Ridotta risposta dell'ACTH e del cortisolo allo stress nei più anziani

CLINICAL STUDY

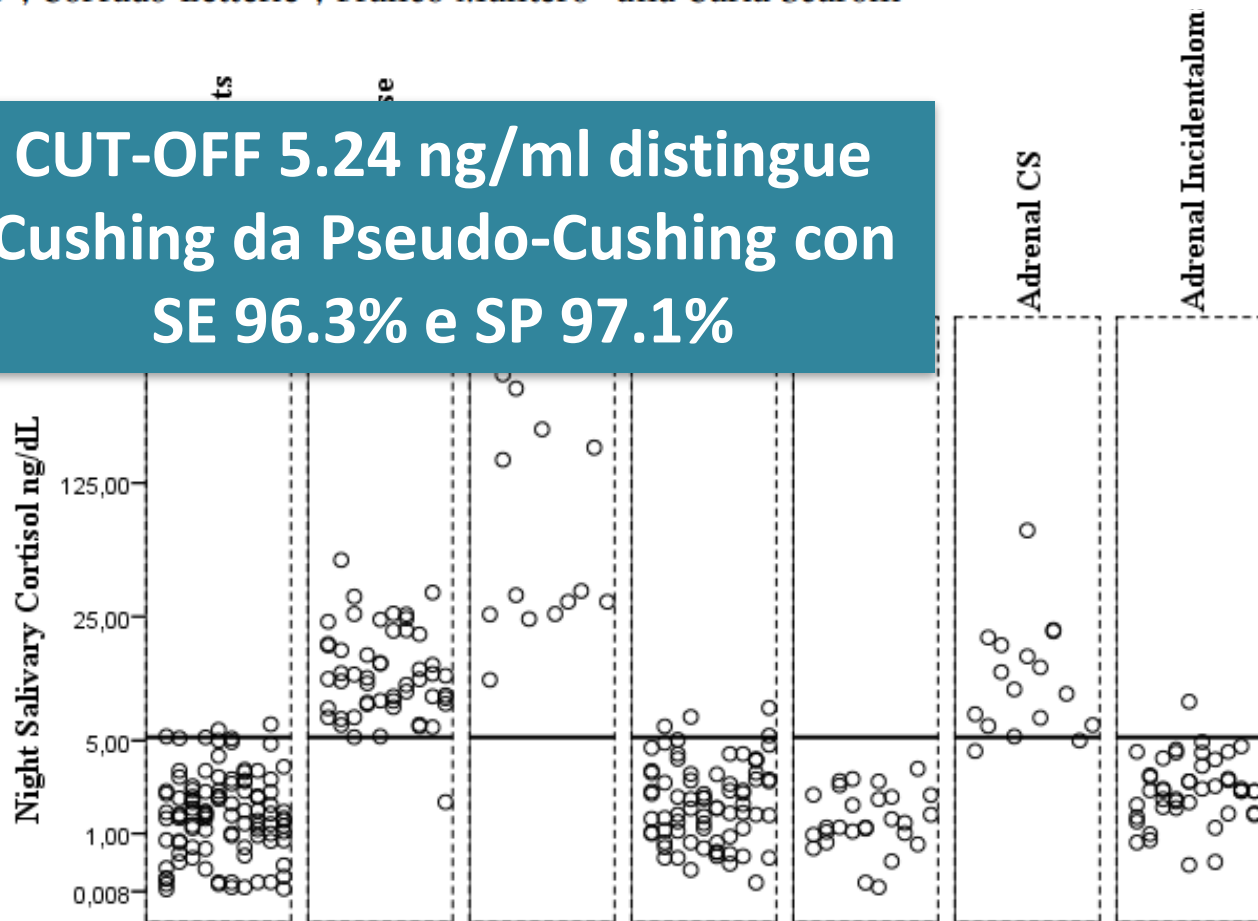
Performance of salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome, adrenal incidentaloma, and adrenal insufficiency

Filippo Ceccato¹, Mattia Barbot¹, Marialuisa Zilio¹, Sergio Ferasin¹, Gianluca Occhi¹, Andrea Daniele¹, Sara Mazzocut¹, Maurizio Iacobone², Corrado Betterle¹, Franco Mantero¹ and Carla Scaroni¹

RIA

- 104 soggetti sani
- 82 pazienti con sindrome di Cushing
- 73 pseudo-Cushing
- 27 pazienti con pregressa sindrome di Cushing in stabile remissione
- 45 incidentalomi surrenalici

CUT-OFF 5.24 ng/ml distingue Cushing da Pseudo-Cushing con SE 96.3% e SP 97.1%



Screening Tests for Cushing's Syndrome: Urinary Free Cortisol Role Measured by LC-MS/MS

J Clin Endocrinol Metab, October 2015, 100(10):3856–3861

Filippo Ceccato, Mattia Barbot, Marialuisa Zilio, Anna Chiara Frigo, Nora Albiger, Valentina Camozzi, Giorgia Antonelli, Mario Plebani, Franco Mantero, Marco Boscaro, and Carla Scaroni

Table 1. SE, SP, LR^{neg}, LR^{pos}, AUC, and Respective 95% CI of Each Test Used for the Diagnosis of Non-CS (n = 99) vs CS (n = 38)

Test	Cutoff	SE, % (95% CI)	SP, % (95% CI)	LR ^{neg} (95% CI) ^a	LR ^{pos} (95% CI)
1-mg DST	50 nmol/L	100 (90.8–100)	91.9 (84.9–95.9)		12.37 (6.37–24.05)
	138 nmol/L	86.8 (72.7–94.2)	96.7 (91.5–99)	0.14 (0.06–0.31)	28.66 (9.34–87.9)
LNSC	14.46 nmol/L	84.2 (69.6–92.6)	88.9 (81.2–93.7)	0.18 (0.09–0.37)	7.58 (4.27–13.45)
UFC	170 nmol per 24 h	97.4 (86.5–99.5)	90.9 (83.6–95.1)	0.03 (0.01–0.2)	10.71 (5.73–20)

^a LR^{neg} not computable if SE = 100%.

Table 3. Number and Percentage of False-Negative (FN) and False Positive (FP) Test Results

	1-mg DST 50 nmol/L n/Total, %	1-mg DST 138 nmol/L n/Total, %	LNSC 14.46 nmol/L n/Total, %	UFC 170 nmol per 24 h n/Total, %
CS	FN 0/38	FN 5/38 (13%)	FN 6/38 (16%)	FN 1/38 (3%)
Non-CS	FP 9/99 (9%)	FP 3/99 (3%)	FP 11/99 (11%)	FP 9/99 (9%)

The paradox of nocturnal salivary cortisol

Cushing's Syndrome

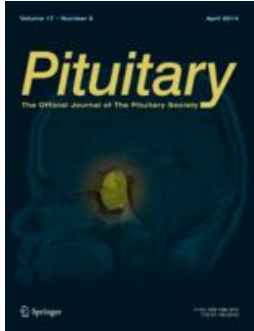
Nocturnal salivary cortisol is the **most useful screening test** for Cushing's Syndrome

Subclinical Cushing's Syndrome

Nocturnal salivary cortisol is **less effective than in CS**

CORTISOLO SALIVARE:

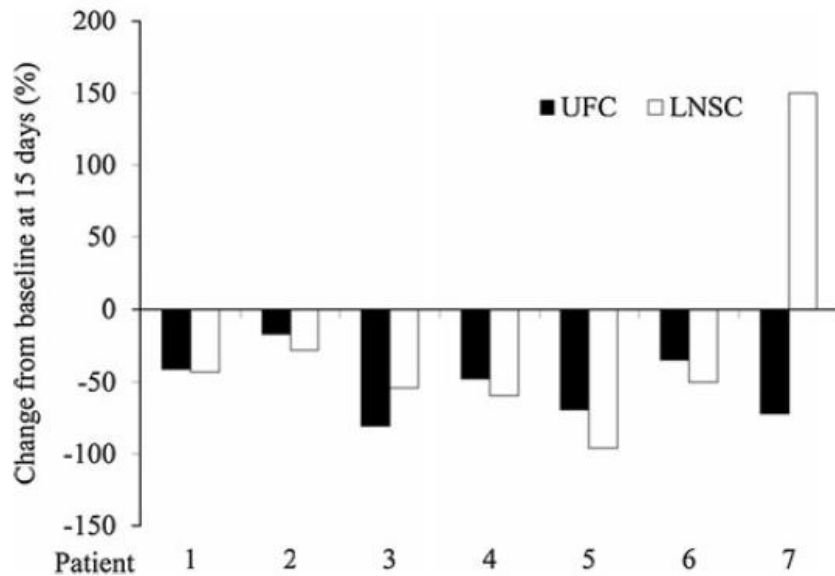
- *Diagnosi della sindrome di Cushing*
 - Screening
 - Conferma
- ***Monitoraggio della terapia medica***



Salivary cortisol is a useful tool to assess the early response to pasireotide in patients with Cushing's disease

Pituitary

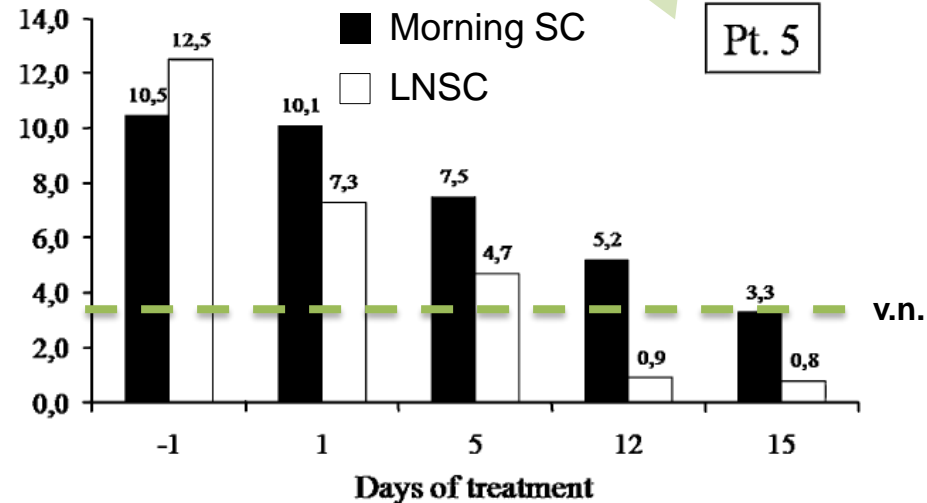
DOI 10.1007/s11102-014-0557-x



The patient who experienced normalization of LNSC with restoration of circadian cortisol rhythm at day 15 also showed normalization of UFC

After 15 days of treatment, pasireotide reduced both UFC and salivary cortisol to a similar degree.

Salivary cortisol (nmol/L)



The role of an acute pasireotide suppression test in predicting response to treatment in patients with Cushing's disease: findings from a pilot study

L. Trementino · M. Zilio · G. Marcelli ·
G. Michetti · M. Barbot · F. Ceccato ·
M. Boscaro · C. Scaroni · G. Arnaldi

	Serum cortisol fall >28 %	Serum cortisol fall >57 %	Plasma ACTH fall >35 %	Plasma ACTH fall >48 %	LNSC fall >27 %
SE	92	46	69	61	91
SP	75	100	75	100	100
PPV	92	100	100	100	100
NPV	66	30	42	37	75

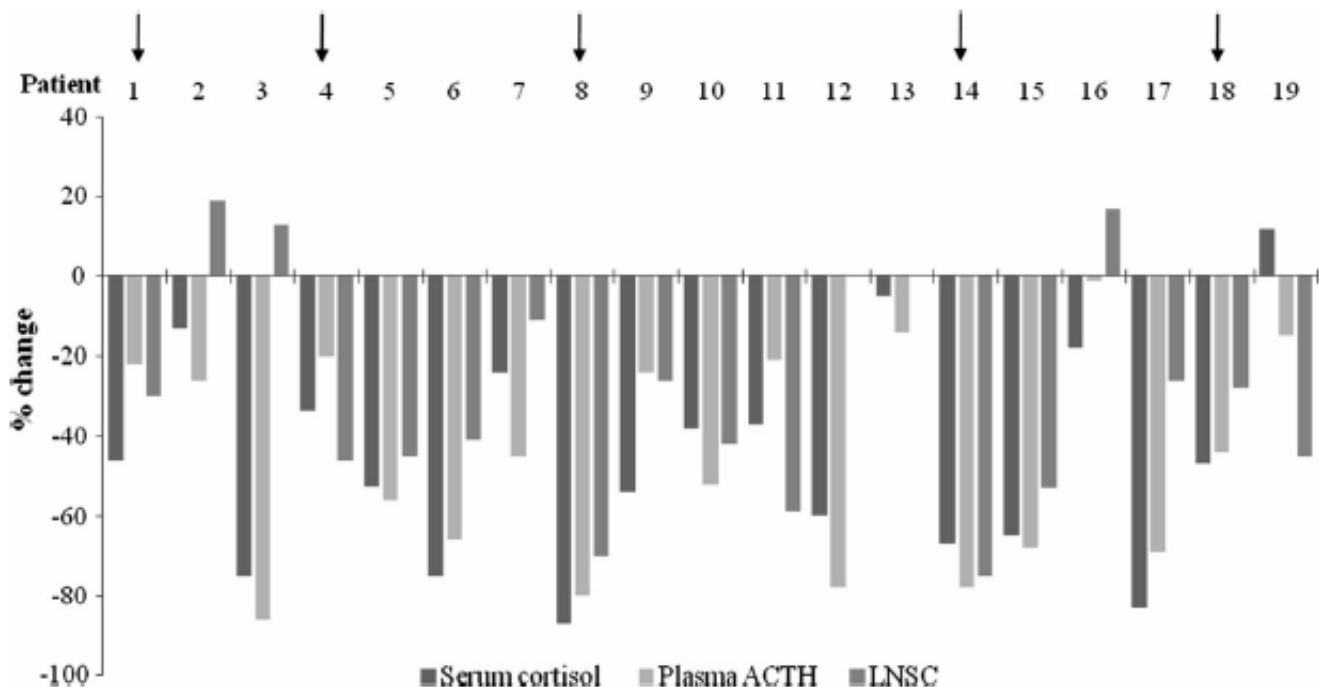
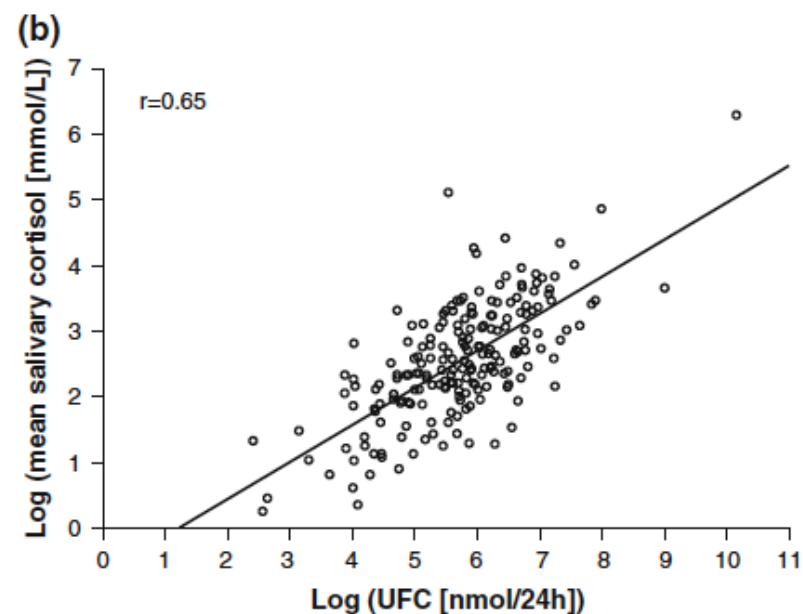
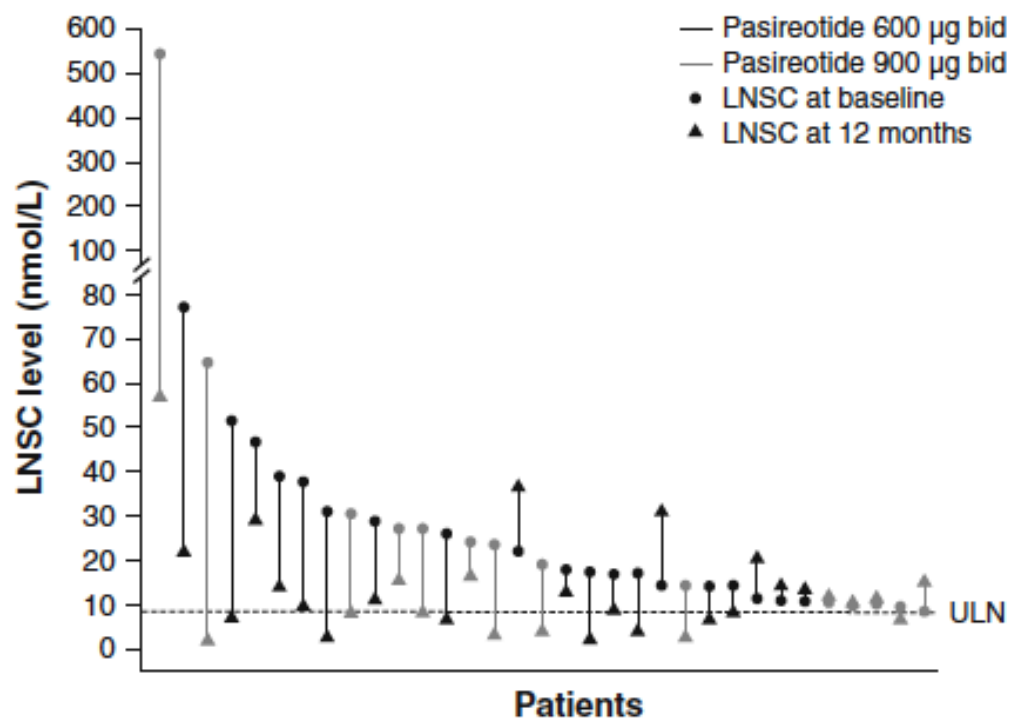


Fig. 1 Serum cortisol, plasma ACTH, and late-night salivary cortisol (LNSC) percentage (%) change from baseline during 2–8 h after 600 µg pasireotide administration for each patient. The *arrows* indicate the patients that normalized LNSC during acute PST

ORIGINAL ARTICLE

Late-night salivary cortisol may be valuable for assessing treatment response in patients with Cushing's disease: 12-month, Phase III pasireotide study

James W. Findling¹ · Maria Fleseriu² · John Newell-Price³ · Stephan Petersenn⁴ · Rosario Pivonello⁵ · Albert Kandra⁶ · Alberto M. Pedroncelli⁶ · Beverly M. K. Biller⁷



Laura Trementino

Grazia Michetti

Marianna Martino

Giorgia Marcelli

Carolina Concettoni

Marina Brugia

Grazie!

.....a tutti voi per l'attenzione !!!