

ACTH TEST 1 µg: INDAGINE INTERNAZIONALE SULL'ACCURATEZZA DELLE DIVERSE PREPARAZIONI

Responsabile Editoriale
Renato Cozzi

Il test di stimolo all'ACTH (utilizzando il derivato sintetico tetracosactide, commercialmente Synacthen) è molto diffuso e ampiamente usato per la diagnosi di insufficienza surrenalica, sia ad alta dose (250 µg) sia a microdose (1 µg). La formulazione commercialmente disponibile è solo da 250 µg in una fiala da 1 mL, che pertanto deve essere diluita in caso di esecuzione del test a microdose. Un'indagine britannica del 2012 (1) riportava ben 14 diversi metodi per preparare 1 µg di ACTH, che si differenziavano per volume e numero di diluizioni o tipo di diluente utilizzato. Solo pochi studi hanno riportato frequenza, tipologia e indicazione di questi protocolli per l'ACTH test nella pratica clinica e ancora meno sono i dati relativi all'accuratezza e riproducibilità delle varie metodiche di preparazione del test a microdose.

Un recente studio inglese (2) ha indagato frequenza e caratteristiche di utilizzo dell'ACTH test, attraverso un questionario *online* distribuito via *mail* ai membri di 6 società internazionali di endocrinologia, sia dell'adulto sia pediatriche. Inoltre, ha valutato precisione e accuratezza dei 10 metodi più frequentemente utilizzati per preparare il test a microdose (tabella). In particolare, ogni protocollo di preparazione è stato eseguito sempre da un unico investigatore per 5 volte, per valutare la variabilità della metodica stessa; per 9 protocolli, che prevedevano una quantità sufficiente di soluzione finale, è stato anche preso un campione da 1 mL da tre diversi parti della siringa o del flacone (porzioni iniziale, centrale e finale), per valutare possibili errori di miscelazione; infine, le concentrazioni finali di ACTH sono state misurate con un test ELISA.

Risultati dell'indagine internazionale: test, dosi, timing, cut-off

Dei 6744 membri sottoposti al questionario hanno risposto in 766 (11%), distribuiti in 60 nazioni (anche se 19 di queste erano rappresentate da un solo membro), di cui 52% endocrinologi dell'adulto, 45% pediatriche e 3% non precisati (in parte perché non clinici).

Dall'indagine è emerso che **il test al Synacthen è il più utilizzato (98%) per la diagnosi di insufficienza surrenalica**, seguito dalla valutazione della cortisolemia basale (da sola - 76% - o con ACTH - 71%), dall'ipoglicemia insulinica (36%) e dal test con glucagone (27%); sono risultati molto meno usati i test con metirapone (4%), clonidina (3%) o CRH (2%).

L'ACTH test ad **alta dose** risultava utilizzato nel 92% dei casi (96% nell'adulto e 88% nel bambino), prevalentemente per la diagnosi di insufficienza surrenalica primaria e iperplasia surrenalica congenita. La via di somministrazione più usata era l'intravenosa (81%), meno frequentemente l'intramuscolo (37%) o la sottocutanea (5%).

L'ACTH test a **microdose** è risultato, invece, utilizzato nel 43% dei casi, soprattutto dagli endocrinologi pediatriche (72% vs 17% di endocrinologi dell'adulto) e preferibilmente per la diagnosi di insufficienza surrenalica secondaria. Le dosi più usate erano 1 µg (86% dei casi), 5-15 µg (8%) oppure 0.1-1 µg/m² di superficie corporea (5%).

L'indagine ha poi evidenziato oltre 30 diverse combinazioni di prelievo per il dosaggio del cortisolo dopo stimolo, le più comuni ai **tempi** 0, 30 e 60 minuti (nel 46% dei test ad alta dose e nel 51% dei microdose) e dopo 20 minuti (nel 17% dei test a microdose).

La **soglia diagnostica** di normale funzione surrenalica era > 500 nmol/L in circa la metà dei casi per entrambi i test al Synacthen; nella restante metà dei casi veniva usata una soglia più alta (> 550 nmol/L) o più bassa (374-475 nmol/L per l'alta dose e 380-495 nmol/L per la microdose).

Risultati sulla valutazione dei diversi ACTH test a microdose

Nove dei 10 diversi protocolli di preparazione del test a microdose hanno evidenziato una **marcata variabilità intra-saggio** (tabella), con coefficiente di variabilità (CV) fino a oltre il 100% in un caso. La minore variabilità (CV 2.1%) era associata al protocollo che prevede la diluizione in soluzione glucosata (n. 6).

Solo 3 metodi di preparazione (n. 1, 4, 6) ottenevano una quantità finale di ACTH da iniettare **con valori vicini alla soglia accettabile** (attorno a 0.9-1.1 µg), mentre **altri 3** (n. 7, 9, 10) risultavano del tutto inaccurati, **con meno della metà della quantità richiesta** (tra 0.16-0.36 µg).



Metodi di preparazione dell'ACTH test a microdose (1 µg) e variabilità intra-saggio					
Preparazione del Synacthen (fl da 250 µg in 1 mL)	Fattore di diluizione	Concentrazione finale attesa di Synacthen	Volume da iniettare (per somministrare 1 µg)	Dose effettivamente iniettata (media ± DS; n = 5)	CV intra-saggio (%)
1. Iniettare tutta la fiala in 1000 mL di S.F.	1000	250 ng/mL	4 mL	0.78 ± 0.09	11.3
2. Aspirare tutta la fiala in una siringa, portando a 10 mL con S.F.; aspirare 1 mL di tale soluzione, portando a 5 mL con S.F.	50	5000 ng/mL	0.2 mL	0.55 ± 0.16	28.9
3. Iniettare tutta la fiala in 250 mL di S.F.	250	1000 ng/mL	1 mL	0.52 ± 0.20	38.8
4. Iniettare tutta la fiala in 50 mL di S.F.; aspirare 1 mL di tale soluzione in una siringa, portando a 10 mL con S.F.	500	500 ng/mL	2 mL	0.78 ± 0.07	9.06
5. Iniettare tutta la fiala in 50 mL di S.F.; aspirare 0.2 mL di tale soluzione in una siringa, portando a 1 mL con S.F.	250	1000 ng/mL	1 mL	0.56 ± 0.09	15.9
6. Iniettare tutta la fiala in 500 mL di S.G. 5%	500	500 ng/mL	2 mL	0.81 ± 0.02	2.1
7. Aspirare 0.2 mL in una siringa contenente 10 mL di S.F.; aspirare 0.2 mL di tale soluzione in una siringa, portando a 1 mL con S.F.	250	1000 ng/mL	1 mL	0.16 ± 0.04	24.7
8. Iniettare 0.2 mL in 50 mL di S.F.	250	1000 ng/mL	1 mL	0.63 ± 0.23	36.4
9. Iniettare 0.1 mL in 50 mL di S.F.	500	500 ng/mL	2 mL	0.36 ± 0.24	65.2
10. Iniettare 0.5 mL in 500 mL di S.F.	1000	250 ng/mL	4 mL	0.17 ± 0.19	109.6

CV: coefficiente di variazione; DS: deviazione standard; S.F: sodio cloruro 0.9% (soluzione "fisiologica"); S.G.: soluzione glucosata con destrosio

Il controllo della concentrazione anche in 2 fiale di Synacthen da 250 µg ha escluso un'influenza dovuta alle metodiche di diluizione del laboratorio necessarie per il test ELISA. La valutazione delle concentrazioni nelle tre parti di siringa o flacone alla fine delle diluizioni ha evidenziato un'ampia variabilità legata alla miscelazione del campione. Non sono state dimostrate differenze della concentrazione finale di ACTH tra i protocolli con una o più diluizioni, con ridotto o alto volume di diluente, in flacone o siringa. Invece, l'utilizzo per la preparazione del test di una dose iniziale ≤ 0.5 mL della fiala di Synacthen (protocolli n. 7, 8, 9, 10) si associava a una

concentrazione finale significativamente ridotta rispetto a quella ottenuta diluendo la fiala intera ($0.365 \pm 0.318 \mu\text{g}$ vs $0.668 \pm 0.212 \mu\text{g}$, rispettivamente, $p < 0.0001$).

Commento

Questo studio conferma come l'ACTH test sia ormai diventato quello più usato per la diagnosi di insufficienza surrenalica, soprattutto di natura primitiva, in accordo con le ultime linee guida (3).

L'uso del test a microdose soprattutto in endocrinologia pediatrica potrebbe dipendere in parte dalla prevalente risposta di clinici americani (97%) e in parte dall'indicazione a questo test per lo studio della funzione surrenalica nelle linee guida sui bambini asmatici in terapia steroidea inalatoria (4). Di contro, il minor utilizzo nell'adulto potrebbe dipendere dalla mancanza di una forte raccomandazione per il suo utilizzo nella diagnosi di iposurrenalismo centrale (5), dai pochi dati a supporto di una sua superiorità diagnostica rispetto al test a dose piena (6,7), dai limiti tecnici e dall'assenza di un protocollo standard di preparazione.

Ancora più interessanti sono i dati relativi all'ampia variabilità e inaccuratezza riscontrati nei diversi metodi di preparazioni dell'ACTH test a microdose. In particolare, questo studio ha evidenziato una quantità finale di ACTH contenuta nel volume da iniettare variabile tra 0.16 e 0.81 μg tra i diversi protocolli, risultando del tutto inadeguata in tre protocolli ($< 0.5 \mu\text{g}$, considerata la dose minima per un test di stimolo con ACTH) (8). Tale variabilità risultava anche intrinseca alla stessa preparazione dei test e alla porzione di flacone o siringa valutata. I protocolli che prevedevano la diluizione iniziale dell'intera fiala di Synacthen e l'uso della soluzione glucosata come diluente presentavano la minor variabilità e la maggior accuratezza nella concentrazione finale di ACTH ottenuta. Studi precedenti avevano evidenziato anche una certa aderenza del Synacthen alla plastica, che a sua volta può interferire sulla dose finale iniettata (9).

In **conclusione**, non esiste una metodica *standard* per la preparazione dell'ACTH test a microdose e alcune tra quelle attualmente più in uso presentano grande variabilità e inaccuratezza della dose finale ottenuta, predisponendo a un **alto rischio di possibili falsi positivi e conseguenti terapie e controlli inadeguati**.

Dato l'ampio utilizzo del test a microdose, soprattutto in età pediatrica, e le importanti conseguenze della sua corretta esecuzione e valutazione, è auspicabile che l'industria farmaceutica possa provvedere a fornire fiale già precostituite con 1 μg di Synacthen.

Bibliografia

1. Elder CJ, Sachdev P, Wright NP. The short Synacthen test: a questionnaire survey of current usage. Arch Dis Child [2012, 97: 870-3](#).
2. Cross AS, Kemp EH, White A, et al. International survey on high- and low-dose synacthen test and assessment of accuracy in preparing low-dose synacthen. Clin Endocrinol (Oxf) [2018, 88: 744-51](#).
3. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, et al. Diagnosis and treatment of primary adrenal insufficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab [2016, 101: 364-89](#).
4. British Thoracic Society. British guideline on the management of asthma. [2014](#) (accesso 11/9/2018).
5. Fleseriu M, Hashim IA, Karavitaki N, et al. Hormonal replacement in hypopituitarism in adults: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab [2016, 101: 3888-921](#).
6. Kazlauskaitė R, Evans AT, Villabona CV, et al. Corticotropin tests for hypothalamic-pituitary-adrenal insufficiency: a metaanalysis. J Clin Endocrinol Metab [2008, 93: 4245-53](#).
7. Ospina NS, Al Nofal A, Bancos I, et al. ACTH stimulation tests for the diagnosis of adrenal insufficiency: systematic review and meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab [2016, 101: 427-34](#).
8. Broide J, Soterman R, Kivity S, et al. Low-dose adrenocorticotropin test reveals impaired adrenal function in patients taking inhaled corticosteroids. J Clin Endocrinol Metab [1995, 80: 1243-6](#).
9. Wade M, Baid S, Calis K, et al. Technical details influence the diagnostic accuracy of the 1 μg ACTH stimulation test. Eur J Endocrinol [2010, 162: 109-13](#).