

Documento di consenso Raccomandazioni sull'impiego clinico dei peptidi natriuretici cardiaci

Michele Emdin¹, Aldo Clerico¹, Francesco Clemenza², Marcello Galvani³, Roberto Latini⁴, Serge Masson⁴, Paolo Mulè⁵, Mauro Panteghini⁶, Roberto Valle⁷, Martina Zaninotto⁸, Antonello Ganau⁹, Rita Mariotti¹⁰, Massimo Volpe¹¹, Nadia Aspromonte¹², Giuseppe Cacciatore¹³, Piero Cappelletti¹⁴, Antonio L'Abbate¹, Federico Miglio⁵, Filippo Ottani³, Franca Pagani¹⁵, Claudio Passino¹, Mario Plebani⁸, Riccardo Sarzani¹⁶, Giancarlo Zucchelli¹

¹Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa, ²ISMETT, Istituto Mediterraneo per i Trapianti e per le Terapie ad Alta Specializzazione, Palermo, ³Unità di Ricerca Cardiovascolare, Fondazione "Sacco", Forlì, ⁴Dipartimento di Ricerca Cardiovascolare, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano, ⁵Dipartimento di Emergenza e Accettazione, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna, ⁶Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Cliniche "Luigi Sacco", Polo di Vialba, Università degli Studi di Milano, ⁷Centro Scompenso, U.O. di Cardiologia, Ospedale Civile, San Donà di Piave (VE), ⁸Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Padova, ⁹Istituto di Clinica Medica Generale e Terapia Medica, Università degli Studi, Sassari, ¹⁰Dipartimento Cardio Toracico, Università degli Studi, Pisa, ¹¹II Cattedra di Cardiologia, Università degli Studi "La Sapienza", Roma, ¹²Unità Scompenso, U.O. di Cardiologia, Ospedale Santo Spirito, Roma, ¹³U.O. di Cardiologia, Ospedale San Giovanni, Roma, ¹⁴U.O. di Cardiologia, A.O. S. Maria degli Angeli, Pordenone, ¹⁵Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche I, A.O. Spedali Civili, Brescia, ¹⁶Clinica di Medicina Interna, Centro Ipertensione e Malattie Cardiovascolari, Laboratorio di Medicina Molecolare, Università Politecnica delle Marche, Ancona

(Ital Heart J Suppl 2005; 6 (5): 308-325)

Sotto l'egida di
Associazione Nazionale
Medici Cardiologi
Ospedalieri (ANMCO),
Società Italiana di
Cardiologia (SIC),
Federazione Italiana di
Cardiologia (FIC),
Società Italiana di
Biochimica Clinica e
Biologia Molecolare
Clinica (SiBioC), Società
Italiana di Medicina di
Laboratorio (SiMEL),
Società Italiana di
Medicina d'Emergenza-
Urgenza (SiMEU).

Ricevuto l'1 marzo 2005.

Per la corrispondenza:

Dr. Michele Emdin

Istituto di Fisiologia
Clinica del CNR
Via G. Moruzzi, 1
56124 Pisa
E-mail: emdin@ifc.cnr.it

PREPARAZIONE DELLE RACCOMANDAZIONI

La scoperta della funzione endocrina del cuore (che somma alla funzione contrattile quelle di regolazione del tono vasomotore e dell'omeostasi idrosalina, e di controregolazione dei principali sistemi vasocostrittori e sodioritettori) e, di pari passo, lo sviluppo di metodologie di dosaggio via via più accurate e di facile e celere applicazione hanno portato a riconoscere la valenza fisiopatologica e clinica (sia diagnostica che prognostica) dei peptidi natriuretici cardiaci (PNC) nella patologia cardiovascolare, in particolare nelle sindromi coronariche acute (SCA) e nello scompenso cardiaco.

Nell'intento di fornire una raccomandazione per l'impiego clinico dei PNC si è costituito un comitato di esperti sia laboratoristi che clinici, ampiamente rappresentativo della realtà nazionale, al fine di dibattere e mettere a fuoco i temi dell'individuazione delle popolazioni di studio, delle indicazioni all'impiego dei PNC, dei protocolli di dosaggio e dell'impiego dei metodi di dosaggio presenti in commercio. Nel periodo aprile-ottobre 2004 si è definito il Documento di Consenso sotto forma di

raccomandazioni per l'impiego clinico dei PNC, che ha poi ricevuto l'approvazione e l'egida delle Società Nazionali di Biochimica Clinica, Medicina di Laboratorio (Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica-SiBioC, Società Italiana di Medicina di Laboratorio-SiMEL), Cardiologia (Associazione Nazionale Medici Cardiologi Ospedalieri-ANMCO, Società Italiana di Cardiologia-SIC, Federazione Italiana di Cardiologia-FIC) e Medicina d'Urgenza (Società Italiana di Medicina d'Emergenza-Urgenza-SiMEU).

Le raccomandazioni sono basate, per quanto possibile, su informazioni pubblicate, considerate dagli esperti le più significative, e riflettono le conoscenze attuali in un campo che vede giorno dopo giorno innovazione metodologica e nuove evidenze cliniche. Questo implicherà necessariamente una continua rivalutazione ed aggiornamento del contenuto delle presenti raccomandazioni. La rilevanza dei dati scientifici che sono di supporto ad ogni raccomandazione è stata caratterizzata impiegando i criteri adottati dall'European Society of Cardiology¹ e dall'American College of Cardiology/American Heart Association² (Tab. I). Per ogni raccomandazione

Tabella I. Classificazione delle raccomandazioni.*Livelli delle prove*

I - Condizioni per le quali vi è evidenza e/o accordo generale che una data procedura o trattamento è utile ed efficace.

II - Condizioni per le quali vi è evidenza conflittuale e/o divergenza di opinioni su utilità/efficacia di una procedura o trattamento.

IIa - Peso dell'evidenza a favore di utilità/efficacia.

IIb - L'utilità/efficacia è meno consolidata dall'evidenza/opinione.

III - Condizioni per le quali vi è evidenza e/o accordo generale che la procedura/trattamento è inutile/inefficace e in alcuni casi potenzialmente dannosa/o.

Forza delle raccomandazioni

A - Dati derivanti da studi clinici multipli randomizzati che hanno coinvolto un grande numero di pazienti.

B - Dati derivanti da un limitato numero di studi clinici multipli randomizzati che hanno coinvolto un piccolo numero di pazienti o dall'analisi di studi non randomizzati o da registri osservazionali.

C - Il consenso tra gli esperti è stata la base fondamentale per la raccomandazione. Indica l'assenza di studi clinici direttamente applicabili di buona qualità.

i numeri romani (da I a III) descrivono il livello di evidenza delle prove e le lettere maiuscole (da A a C) la forza della raccomandazione stessa, considerando la tipologia delle prove ed il consenso ottenuto.

SINDROME CORONARICA ACUTA E SCOMPENSO CARDIACO: IMPATTO EPIDEMIOLOGICO E SOCIALE

Le SCA, l'infarto miocardico con sopraslivellamento del tratto ST e le sindromi associate con sottoslivellamento del tratto ST, alterazioni dell'onda T o nessuna modificazione elettrocardiografica, comprendenti angina instabile e infarto miocardico senza sopraslivellamento del tratto ST, rappresentano la più importante causa di morte nel mondo occidentale, con un elevato impatto socio-economico³.

Lo scompenso cardiaco congestizio (SCC) è la più comune diagnosi di dimissione tra i pazienti > 65 anni nei paesi europei e nordamericani⁴⁻⁶. L'impatto dello SCC è enorme; si registrano centinaia di migliaia di nuovi casi per anno, milioni di ricoveri e centinaia di migliaia di decessi, per un costo totale stimato di 30 miliardi di dollari nei soli Stati Uniti⁴. In Italia, i dati di ricovero per DRG indicano lo scompenso come sesta causa di ricovero (284 casi per 100 000 abitanti), al primo posto per numero di giornate di degenza e quindi per costi.

L'insufficienza cardiaca è una malattia insidiosa e progressiva; molti soggetti affetti, in particolare tra i pazienti più anziani, si trovano in uno stadio tardivo della malattia al momento della diagnosi e dell'inizio

della terapia, con un conseguente riflesso sulle statistiche riguardanti la mortalità, come dimostrato anche da registri nazionali come l'IN-CHF Registry⁷. Dopo il primo ricovero per SCC, il tasso di sopravvivenza a 5 anni è di circa il 30% per gli uomini tra 67 e 74 anni di età, di circa il 20% per gli uomini tra 75 e 84 anni di età, e del 15% in quelli di età > 85 anni⁶.

BIOCHIMICA E FISIOPATOLOGIA DEI PEPTIDI NATRIURETICI CARDIACI**Biochimica dei peptidi natriuretici cardiaci**

La presenza di granuli di secrezione nelle cellule atriali di mammiferi è nota fin dal 1956^{8,9}, ma solo più recentemente è stato dimostrato che il cuore dei mammiferi (compreso l'uomo) produce ormoni peptidici¹⁰. I primi ormoni identificati sono stati il peptide natriuretico di tipo A o atriale (ANP) e successivamente il peptide natriuretico di tipo B o cerebrale (BNP), così denominato perché isolato per la prima volta nel cervello di suino¹¹⁻¹⁵. Alla stessa famiglia di peptidi si è poi aggiunto il peptide natriuretico di tipo C (CNP), che è prevalentemente prodotto e secreto dalle cellule endoteliali ed a livello del sistema nervoso centrale, e l'urodilattina, che è invece prodotta e secreta dal rene e non circola nel plasma, ma si ritrova solo nelle urine¹¹⁻¹⁵. È stato per ultimo identificato nel plasma dei mammiferi un nuovo peptide, chiamato "dendroaspis natriuretic peptide", la cui origine, come anche la sua importanza fisiopatologica è ancora, al momento, incerta¹⁶.

Le varie famiglie di ormoni natriuretici presentano tutte la stessa conformazione strutturale con una catena peptidica, caratterizzata da un anello chiuso da un ponte cisteinico. La sequenza aminoacidica di questo anello è molto simile nei diversi ormoni natriuretici e risulta conservata nelle diverse specie animali, poiché è proprio questa porzione della molecola che si lega ai recettori specifici. Per contro, le sequenze aminoacidiche ormonali poste ai due estremi terminali dei vari peptidi si differenziano notevolmente, sia per la lunghezza sia per il tipo di residui aminoacidici.

I PNC prodotti e secreti in prevalenza dal cuore sono i peptidi correlati all'ANP e al BNP. I miocardiociti producono i PNC sotto forma di pro-ormoni, con una catena aminoacidica molto più lunga dell'ormone attivo circolante. Ad esempio, il BNP è immagazzinato come pro-ormone con una catena di 108 aminoacidi (proBNP), che al momento del rilascio si suddivide per via enzimatica in un frammento inattivo, NH₂-terminale proBNP₁₋₇₆ (NT-proBNP), e nella forma biologicamente attiva, cioè il BNP vero e proprio (frammento COOH-terminale del proBNP₇₇₋₁₀₈). È importante sottolineare come tutti questi peptidi (proBNP, NT-proBNP e BNP) si possano isolare nel plasma¹⁷⁻²¹. Inoltre, la concentrazione plasmatica del peptide precursore intatto proBNP sembra aumentare progressivamente

rispetto a quella dei due peptidi derivati dalla sua degradazione proteolitica (BNP e NT-proBNP) nei pazienti con SCC in relazione all'aggravarsi della disfunzione miocardica¹⁷⁻¹⁹.

Regolazione della sintesi/secrezione dei peptidi natriuretici cardiaci

L'ANP e il BNP sono prodotti e secreti sia a livello atriale che ventricolare, sebbene si ritenga che l'ANP sia presente con una più elevata concentrazione nel tessuto atriale, mentre la concentrazione del BNP sia più elevata a livello ventricolare, soprattutto nei soggetti sottoposti a stress cronico parietale. Inoltre, gli stimoli adeguati alla produzione e alla secrezione degli ormoni a livello atriale e ventricolare potrebbero essere differenti^{11,12}.

A differenza di quelle atriali le miocellule ventricolari non presentano granuli di secrezione riconoscibili al microscopio elettronico, almeno nei soggetti normali^{11,12}. Recenti osservazioni hanno invece dimostrato la presenza di granuli di secrezione in pazienti con cardiomiopatia^{22,23}. Inoltre, poiché la massa ventricolare è molto superiore rispetto a quella atriale, uno stimolo cronico induce l'immissione in circolo di molte più molecole di BNP che di ANP. Nello SCC si osserva che il rapporto fra il numero di molecole circolanti di BNP rispetto a quelle di ANP tende ad aumentare con la gravità della disfunzione miocardica e della sintomatologia; mentre nel soggetto normale il rapporto fra le molecole di BNP ed ANP risulta circa uguale all'unità, nello SCC avanzato (classe funzionale NYHA III-IV) vi sono mediamente da 3 a 5 molecole circolanti di BNP per una di ANP¹³. Per questo motivo, il dosaggio del BNP possiede generalmente una sensibilità ed un'accuratezza diagnostica migliori di quello dell'ANP in pazienti con malattie cardiache²⁴. Questa è la ragione per cui nel presente documento si parlerà soprattutto dell'importanza clinica del BNP e dei peptidi ad esso correlati (cioè proBNP e NT-proBNP).

Lo stimolo predominante per la secrezione e produzione a livello atriale dei PNC è lo stiramento della parete atriale^{11,12}. Per tale motivo tutte le cause che determinano distensione atriale, attraverso un aumento del ritorno venoso (ad esempio, esercizio fisico, variazioni posturali, immersione) producono un innalzamento rapido delle concentrazioni circolanti dell'ANP, piuttosto che del BNP.

Per contro, si ritiene che la distensione delle pareti ventricolari, come anche l'ipertrofia e la fibrosi, possano stimolare la produzione ormonale da parte delle fibrocellule miocardiche^{11,12,24-26}. Più recentemente, alcuni studi hanno suggerito che anche l'ischemia (o forse perfino la sola ipossia) del tessuto miocardico possa stimolare la produzione/secrezione del BNP dei cardiomiociti ventricolari²⁷⁻²⁹. Questi risultati potrebbero

spiegare l'aumento dei livelli di BNP in pazienti con SCA senza dilatazione significativa delle camere ventricolari²⁷. La possibile presenza di alterazione della funzione diastolica e la significativa correlazione tra concentrazioni di BNP e NT-proBNP e mortalità nei pazienti con angina instabile e funzione ventricolare sistolica normale sembra supportare infatti l'ipotesi che l'ischemia miocardica possa stimolare la sintesi e la secrezione di BNP in assenza di necrosi²⁷⁻³¹.

È importante sottolineare come si sia reso evidente da studi sperimentali *in vivo* ed *ex-vivo* che la produzione/secrezione del BNP sia finemente regolata da complessi scambi con il sistema neurormonale ed immunitario. Infatti, la noradrenalina, l'endotelina e l'angiotensina II sono annoverati fra i più potenti agenti stimolatori della produzione/secrezione dei PNC^{11,12,31}, ma anche i glucorticoidi, gli estrogeni, gli ormoni tiroidei, alcuni fattori di crescita, ed inoltre alcune citochine (come il fattore di necrosi tumorale- α , l'interleuchina-1 e l'interleuchina-6) svolgono un'azione stimolatrice sul sistema dei PNC^{11,12,32-40}.

A sua volta il sistema dei PNC svolge un'azione inibitrice sul sistema neurormonale ed immunologico^{11,12,30,41-45}. Numerosi studi suggeriscono come il sistema dei PNC, oltre a svolgere una potente azione controregolatrice, diuretica, natriuretica e vasodilatatrice, rispetto al sistema neurormonale, possieda anche un'azione che contrasta i fenomeni del rimodellamento ventricolare e vascolare, compresa la risteno post-angioplastica⁴⁶⁻⁵⁰. Tali effetti si esplicano fino a livello del microcircolo, dove i PNC svolgono una funzione diretta a contrastare la disfunzione endoteliale. Si ricordi a questo proposito che l'endotelio produce il CNP che svolge soprattutto un'azione paracrina a livello vasale^{46,50}.

Concentrazioni plasmatiche del peptide natriuretico di tipo B e del frammento aminotermine del propeptide natriuretico di tipo B: considerazioni fisiopatologiche

Come ricordato, la produzione di BNP è stimolata non solo da fattori emodinamici, che portano ad un aumento della distensione delle camere cardiache e/o all'aumento dello stress parietale ventricolare, ma anche dall'attivazione del sistema dei neurormoni. È importante sottolineare come la risposta del BNP alla stimolazione dei neurormoni e citochine sia di tipo logaritmico: a piccole, brevi sollecitazioni corrispondono più grandi variazioni delle concentrazioni circolanti di BNP^{13,51}. È quindi possibile che anche piccole variazioni dei parametri emodinamici, magari non valutabili con esami strumentali, producano significative variazioni delle concentrazioni circolanti del BNP.

Nella valutazione delle concentrazioni di BNP (o NT-proBNP) è importante sottolineare che il sesso e

l'età giocano un ruolo fondamentale^{13,51,52}. Infatti, è ben noto come le donne in età fertile presentino valori di BNP e di NT-proBNP circa 2 volte superiori rispetto ai maschi di pari età. Inoltre, dopo i 50 anni i valori di PNC aumentano in entrambi i sessi, per cui un uomo di 60 anni può avere concentrazione di BNP doppia rispetto a un soggetto di 30 anni^{13,51,52}.

Le concentrazioni plasmatiche di BNP e NT-proBNP possono essere aumentate anche in alcune condizioni fisiologiche (soprattutto esercizio fisico e gravidanza) e patologiche, caratterizzate soprattutto da aumento del volume circolante effettivo e da ritenzione di liquidi e sali con iperaldosteronismo primitivo o secondario, come anche per la somministrazione di farmaci (estroprogestinici, ormoni tiroidei, cortisonici, simpaticomimetici con attività betastimolante, digitale, talvolta anche betabloccanti)¹³ (Tab. II). È importante sottolineare che in alcune di queste condizioni la gittata cardiaca può essere normale od addirittura lievemente aumentata (ad esempio nell'esercizio fisico o ipertiroidismo). Per contro, in altre condizioni morbose, caratterizzate da elevati valori di BNP (malattie renali, disturbi idroelettrolitici, cirrosi epatica, malattie polmonari, ecc.), vi possono essere sintomi caratteristici di insufficienza cardiaca, come edemi periferici, fatica o anche dispnea. In questi casi, si possono quindi evidenziare discordanze fra i risultati degli esami strumentali cardiologici (in primo luogo l'esame ecocardiografico), i sintomi e la concentrazione plasmatica di BNP/NT-proBNP.

ASPETTI ANALITICI E PREANALITICI DELLA DETERMINAZIONE DI PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B E DEL FRAMMENTO AMINOTERMINALE DEL PROPEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B

Caratterizzazione dell'antigene misurato

Relativamente poco si conosce sul tipo di molecole presenti nel sangue in condizioni fisiologiche e fisiopatologiche^{20,21}. È probabile che a livello del plasma, liquido biologico generalmente utilizzato per le determinazioni biochimiche, siano presenti tutte le molecole metabolicamente correlate ad eccezione del pre-proBNP¹⁸⁻²¹. La comprensione delle possibili discrepanze metodologiche è resa ancora più difficile dall'eterogeneità molecolare dei peptidi derivati dal proBNP, presenti in circolo nei soggetti sani e nei pazienti con SCC, la cui natura non è ancora stata completamente chiarita. È stato, ad esempio, dimostrato che la sequenza aminoterminale del proBNP e dei peptidi da esso derivati, come il NT-proBNP, contiene una zona ricca di leucina che favorirebbe la formazione in circolo di oligomeri e quindi di forme molecolari multiple, con la possibilità che alcuni epitopi siano più esposti ed altri invece nascosti al riconoscimento dei diversi anticorpi utilizzati nei metodi di determinazione⁵³. C'è infine da rilevare che il BNP viene degradato proteoliticamente *in vivo* e *in vitro* attraverso il distacco dei due aminoacidi aminoterminali serina77-prolina78 per azioni di proteasi plasmatiche¹⁹.

Tabella II. Principali condizioni cliniche in cui le concentrazioni plasmatiche di peptide natriuretico di tipo B e di frammento aminoterminale del propeptide natriuretico di tipo B sono alterate.

Malattia	Concentrazioni di PNC
Malattie cardiovascolari	
Scompenso cardiaco	Molto aumentate
SCA e infarto miocardico acuto	Aumentate
Ipertensione con IVS e fibrosi	Lievemente aumentate
Tachiaritmie sopraventricolari	Aumentate
Malattie respiratorie	
Dispnea acuta	Normali o lievemente aumentate
Embolia polmonare	Aumentate
Malattie respiratorie croniche	Normali o lievemente aumentate
Ipertensione polmonare primitiva	Aumentate
Malattie endocrino-metaboliche	
Ipertiroidismo	Lievemente aumentate
Ipotiroidismo	Lievemente diminuite
Sindrome di Cushing	Aumentate
Iperaldosteronismo (primitivo/secondario)	Aumentate
Diabete mellito	Normali o aumentate
Cirrosi epatica con ascite	Aumentate
Insufficienza renale (acuta o cronica)	Aumentate
Shock settico	Aumentate
Amiloidosi	Normali o aumentate
Emorragia subaracnoidea	Normali o aumentate
Sindromi paraneoplastiche	Normali o aumentate
Terapia antineoplastica	Normali o aumentate

IVS = ipertrofia ventricolare sinistra; PNC = peptide natriuretico cardiaco; SCA = sindrome coronarica acuta.

Specificità degli anticorpi

Molti degli aspetti relativi alle diversità metodologiche dipendono dalla diversa specificità degli anticorpi utilizzati nei test. È chiaro che, secondo la diversa combinazione anticorpale presente nel *sandwich*, i metodi sono in grado di misurare una o più molecole presenti nel plasma. Ad esempio, considerando i metodi di dosaggio del BNP, se la combinazione di un anticorpo contro la struttura ad anello con un anticorpo contro l'estremo N-terminale può essere specifica per il BNP, l'impiego di un anticorpo anti-estremo C-terminale in associazione con uno verso la struttura ad anello misura anche il proBNP in aggiunta al BNP^{18,19}. D'altro canto la prima combinazione è molto sensibile ai fenomeni proteolitici prima ricordati, cosa che si traduce in una significativa instabilità del campione. Anche per la determinazione del NT-proBNP, il sito di reazione anticorpale è vitale per la specificità dell'immunodosaggio; è importante ricordare che per i metodi che dichiarano di misurare il NT-proBNP raramente è valutata la crossreattività tra proBNP, NT-proBNP ed i suoi prodotti di scissione.

Configurazione e specificità dei metodi commerciali

Sarebbe corretto affermare che, considerando quanto oggi disponibile commercialmente, esistono due gruppi di metodologie. Il primo, impiegando un *sandwich* anticorpale reattivo verso la struttura ad anello (aminoacidi 90-97) e l'estremo N-terminale del BNP (aminoacidi 77-86), è specifico per la misura dell'ormone biologicamente attivo (BNP). Il secondo gruppo, più eterogeneo, è composto da metodi che, pur dichiarando di misurare BNP o NT-proBNP, in realtà misurano il proBNP e tutti (o alcuni) suoi prodotti metabolici, inclusi il BNP e il NT-proBNP, con specificità variabile. È tuttavia chiaro che per l'impiego della determinazione di questi peptidi natriuretici come indicatori biochimici di alterazione funzionale cardiaca, e non per la valutazione di un ormone biologicamente attivo e delle

sue eventuali alterazioni, entrambi gli approcci analitici possono essere accettabili, una volta dimostrata la loro utilità clinica.

Nel recente passato sono stati proposti metodi immunologici non competitivi, utilizzando anticorpi policlonali o monoclonali, marcati con traccianti isotopici, enzimatici o fluorogenici, e antigeni, impiegati per la calibrazione del sistema analitico, di origine sintetica o costituiti da materiale di origine ricombinante^{54,55}. Nonostante la completa automazione dei metodi di determinazione commercialmente disponibili permetta di ottenere risultati in tempi brevi e con ottima precisione analitica, permane tuttavia una significativa dipendenza dei risultati dal tipo di metodo impiegato, proprio a causa dell'eterogeneità metodologica, dovuta alla diversa specificità degli anticorpi impiegati e alla diversa standardizzazione analitica derivata dall'impiego di differenti materiali di calibrazione. In aggiunta a ciò, bisogna anche ricordare che molte delle valutazioni cliniche presenti in letteratura sono state eseguite con metodologie non commerciali, "home-made", e per questo i risultati in esse riportati non sono immediatamente confrontabili e trasferibili ad altre realtà e ad altre metodologie^{56,57}. Infine, la discrepanza riportata tra le concentrazioni ottenute con metodi diversi si riflette direttamente sul valore dei limiti di riferimento e livelli decisionali corrispondenti che spesso variano secondo il metodo utilizzato (Tab. III)^{29,57,58}.

È del tutto evidente quindi la necessità di una standardizzazione che, attraverso la selezione di appropriati materiali di riferimento e di un'adeguata procedura per poterli certificare, ma soprattutto attraverso la chiara definizione dell'analita che si vorrebbe misurare, consenta di ottenere risultati sovrapponibili anche quando ottenuti con metodi diversi^{58,59}. Nel frattempo, al fine di poter impiegare correttamente la determinazione di questi marcatori nella pratica clinica, è obbligatorio utilizzare limiti di riferimento e livelli decisionali che siano stati stabiliti in funzione del metodo analitico utilizzato e che non siano invece semplicemente estrapolati o derivati da altri metodi.

Tabella III. Valori di riferimento ed imprecisione analitica relativi ad alcuni metodi commercialmente disponibili per la determinazione di peptide natriuretico di tipo B (BNP) e di frammento aminoterminale del propeptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP).

Metodo	Media $\pm$ SD	Mediana	Range	97.5° percentile	15% CV
IRMA BNP	10.7 $\pm$ 9.9	7.1	0.4-66.1	40	20
MEIA BNP	22.2 $\pm$ 29.7	13.4	< 5-220.7	105	100
ADVIA BNP	13.5 $\pm$ 11.9	9.4	< 3-65.9	45	20
POCT BNP	10.4 $\pm$ 7.2	7.6	< 8-62.5	40	15
ECLIA NT-proBNP	49.4 $\pm$ 35.4	40.9	6.7-219.8	155	< 15

I valori sono espressi come ng/l. ADVIA BNP = metodo per analizzatore Centaur (Bayer Diagnostici); CV = coefficiente di variazione; ECLIA NT-proBNP = metodo in elettrochemiluminescenza per analizzatore Elecsys (Roche Diagnostici); IRMA BNP = metodo immunoradiometrico manuale (Shionogi); MEIA BNP = metodo "microparticle enzyme immunoassay" per analizzatore AxSYM (Abbott Diagnostici); POCT BNP = metodo "point-of-care testing" Triage (Biosite Diagnostici). Da Clerico et al.⁵⁸, modificata.

Interferenze

Almeno per i principali metodi commercialmente disponibili, non sono segnalati particolari problemi con i più importanti interferenti endogeni (emolisi, iperbilirubinemia, ipertrigliceridemia). Esistono invece importanti aspetti relativi al tipo di campione utilizzabile e alla sua stabilità *in vitro*. Per la determinazione del BNP, data la sua possibile degradazione *in vitro*, si consiglia generalmente l'impiego di un campione in EDTA con l'eventuale aggiunta di inibitori delle proteasi plasmatiche^{17-19,58}. Per contro, per la determinazione del NT-proBNP con metodo ECLIA sono raccomandati campioni di siero o plasma eparinato⁶⁰. Con lo stesso metodo è stata segnalata una differenza significativa fra i valori ottenuti con campioni di siero o plasma eparina rispetto a campioni in plasma EDTA⁶⁰.

Un altro aspetto importante è l'impossibilità di usare provette di vetro per la raccolta del sangue, necessario per la determinazione del marcatore, con i metodi che utilizzano la combinazione anticorpale con epitopi aminoacidi 90-97/aminoacidi 103-107. Infatti, questa combinazione è altamente suscettibile all'effetto della callicreina, proteasi plasmatica attivata dal contatto con il vetro della provetta, che degradando l'estremo C-terminale del BNP (e del proBNP) non lo rende più riconoscibile al *sandwich* anticorpale^{17,61}. L'impiego di provette di plastica per il prelievo garantisce la stabilità del campione con questi metodi.

Relativamente alla stabilità *in vitro*, bisogna infine notare che, mentre non esistono problemi per il NT-proBNP^{60,62,63}, l'ormone BNP è più instabile perché può essere privato per fenomeni proteolitici dei due aminoacidi N-terminali, cosa importante quando il metodo impiegato utilizzi un anticorpo contro questo epitopo^{18,63}.

Variabilità biologica

Per la corretta interpretazione dei risultati di questi marcatori biochimici è importante valutare attentamente l'entità della variazione fisiologica nell'individuo studiato. È stato recentemente dimostrato che la variabilità dei risultati di BNP e NT-proBNP nel tempo è quasi totalmente dovuta alla variabilità biologica del marcatore, con pressoché nulla incidenza della variabilità analitica (imprecisione) sulla variazione totale delle concentrazioni plasmatiche dello stesso^{64,65}. Il coefficiente di variazione che riflette la variabilità media nel soggetto (coefficiente di variazione intraindividuale) è mediamente > 30%, con la conseguenza che questa elevata individualità del marcatore rende molto difficile l'utilizzo dei limiti di riferimento ottenuti da studi di popolazione^{66,67}.

Dalla variabilità biologica si possono anche derivare alcune importanti specifiche di qualità per gli analiti considerati. Ad esempio, è accettato che l'imprecisione

analitica di un test non influenzi significativamente il suo uso clinico quando essa non superi la metà del valore del coefficiente di variazione biologico intraindividuale⁶⁸. Stante l'elevata variabilità biologica di questi marcatori, è quindi chiaro che un'imprecisione analitica molto bassa dei metodi di determinazione non sembra essere indispensabile, essendo accettabili coefficienti di variazione analitici non superiori al 15%.

Considerazioni conclusive

I limiti di riferimento ed i livelli decisionali utilizzati nei vari studi clinici sono metodo-dipendenti e non possono essere estrapolati per altre metodologie. Nella valutazione del valore clinico dei test bisogna considerare il metodo utilizzato per ottenere i risultati, dal momento che non esistono metodi differenti che diano risultati fra loro equivalenti.

Inoltre, fino a che la specificità analitica dei test non sarà chiarita e di conseguenza una definitiva standardizzazione non sarà ottenuta, è consigliabile utilizzare come unità di misura ng/l, e non pmol/l.

RACCOMANDAZIONE 1

Raccomandazione 1. Tutti i nuovi test proposti dovrebbero essere valutati prima del loro utilizzo clinico, per le seguenti caratteristiche analitiche e preanalitiche:

- tipo di antigene utilizzato come calibratore;
- specificità anticorpale e identificazione dei relativi epitopi;
- crossreattività con tutte le molecole affini presenti nel plasma, a cominciare dal proBNP (aminoacidi 1-108);
- interferenze relative a:
 - principali interferenti endogeni,
 - principali tipi di campione biologico (siero, plasma con differenti anticoagulanti),
 - tipo di provetta utilizzata per il prelievo,
 - stabilità del campione alle varie temperature di conservazione.

Livello di raccomandazione: classe I.

Livello di evidenza: tipo C.

IMPIEGO DI PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B/ FRAMMENTO AMINOTERMINALE DEL PROPEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B NELLO SCOMPENSO CARDIACO

Premessa

Non esiste una definizione di insufficienza cardiaca che sia accettata universalmente e pienamente soddisfacente in tutte le condizioni cliniche^{4-6,69}. L'insufficienza cardiaca è una sindrome complessa che può derivare da qualsiasi alterazione della struttura o funzionalità cardiaca che comprometta la capacità del cuore di garantire

una portata cardiaca alle esigenze metaboliche dei tessuti periferici^{4-6,69}. La sindrome è caratterizzata clinicamente da sintomi aspecifici, come la dispnea e la fatica e da segni come la ritenzione di fluidi con edemi^{4-6,69}.

Lo SCC è un costoso problema sanitario in continua crescita, che affligge lo 0.4-3% della popolazione europea, ma solo il 50% di tutti i pazienti sopravvive fino a 4 anni dalla diagnosi^{4-6,69}. Lo scompenso rappresenta la principale causa di ospedalizzazione nella popolazione più anziana nei paesi industrializzati e la sua prevalenza in aumento è dovuta all'invecchiamento della popolazione, così come al notevole aumento della sopravvivenza di pazienti colpiti da infarto miocardico⁶.

Stime conservative suggeriscono che nei paesi nord-americani ed europei in più del 50% dei casi l'insufficienza cardiaca ha un'origine ischemica, mentre l'ipertensione arteriosa è fattore contribuente fino al 75% dei casi; la miocardiopatia dilatativa idiopatica sembra esserne la causa solo nel 10-20% dei pazienti^{5,6,69}.

Non vi è un singolo test diagnostico su cui fondare la diagnosi di insufficienza cardiaca, perciò il clinico si deve avvalere di tutti i dati disponibili, derivanti dall'anamnesi, dall'esame clinico e da appropriati esami strumentali e di laboratorio⁴⁻⁶. Recenti studi hanno evidenziato come l'accuratezza della diagnosi clinica sia spesso inadeguata, particolarmente nelle donne, nelle persone anziane e negli obesi⁴⁻⁶. Altri studi hanno evidenziato che meno del 40% dei pazienti diagnosticati dal medico generico come sofferenti di SCC ha visto confermare questa diagnosi dopo un consulto dallo specialista^{3-6,69,70}.

Per tali motivi la disponibilità di un esame di laboratorio che sia nel contempo accurato, affidabile e dotato di un buon rapporto costo/beneficio, così da essere in grado di aiutare il clinico nello screening nella diagnostica differenziale e nel trattamento dei pazienti con SCC, assume una grande rilevanza.

Numerosi studi hanno dimostrato che il dosaggio del BNP o del NT-proBNP può assumere una rilevanza nell'assistere il clinico nella diagnostica, nel monitoraggio e nel trattamento dello SCC. Si rimanda ad alcune recenti rassegne per un'analisi approfondita dell'argomento^{6,14,29,70-79}.

Le diverse indicazioni riguardanti l'uso dei PNC nello SCC saranno presentate sulla base del peso delle evidenze scientifiche disponibili in letteratura.

Negli studi riportati in questa sezione non si accennerà in maniera specifica né alla natura del peptide misurato (si parlerà indifferentemente di BNP o NT-proBNP), né al metodo analitico utilizzato, rimandando il lettore alle sezioni precedenti che hanno affrontato questi aspetti.

Prognosi nell'insufficienza cardiaca sintomatica

Concentrazioni elevate di PNC predicono un esito negativo in termini di sopravvivenza in pazienti ambu-

latoriali con SCC e risultano l'indicatore più forte di rischio cardiovascolare e di morte in questi pazienti, se confrontati con altri marcatori bioumorali^{29,70,73,80-86}. Nel contesto di un grande studio clinico internazionale, in una popolazione relativamente selezionata di circa 4300 pazienti con SCC, è stato dimostrato che il BNP ha un valore prognostico significativo in termini di mortalità e di morbidità quando si aggiunge a un modello che include variabili cliniche, demografiche ed ecocardiografiche⁸⁵. Questo valore prognostico è stato recentemente definitivamente confermato in uno studio clinico randomizzato⁸⁶. Non esistono tuttavia dati sufficienti per affermare che misure di BNP ripetute nel tempo in un singolo paziente abbiano un valore prognostico superiore ad una unica determinazione^{87,88}.

Diagnosi nell'insufficienza cardiaca cronica

Le linee guida della Società Europea di Cardiologia riportano che i PNC possono essere utilizzati nella diagnosi di insufficienza cardiaca in soggetti sintomatici, in particolare come test iniziale per la sua esclusione ("rule out")⁵, come confermato da una recente metanalisi⁸⁹. La Food and Drug Administration, autorità regolatrice negli Stati Uniti, ha approvato l'uso del dosaggio del BNP nel novembre 2000 e del NT-proBNP nel novembre 2002 come esami di laboratorio che possono contribuire a diagnosticare lo SCC.

Tuttavia, la definizione di un livello decisionale utile ad identificare soggetti con insufficienza cardiaca cronica non riscontra un consenso unanime²⁹. Oltre a differenze nella definizione delle "soglie" di discriminazione fra "patologico" e "normale", legate sia alla natura del peptide misurato (BNP, NT-proBNP) che al metodo analitico scelto, la concentrazione plasmatica dei PNC in soggetti privi di patologie cardiovascolari tende ad aumentare con l'età e ad essere più elevata nelle donne rispetto agli uomini^{29,52,90-92}, da cui la proposta di usare livelli decisionali variabili in funzione dell'età e del sesso⁷⁸.

Altri fattori possono inoltre influenzare la concentrazione plasmatica di BNP/NT-proBNP, in particolare l'obesità, fattori genetici e anche forse la presenza di disfunzione renale, epatica o polmonare e il trattamento medico, come già discusso⁹³⁻⁹⁵ (Tab. II). L'insieme di questi fattori contribuisce ad aumentare la dispersione delle concentrazioni dei PNC nei pazienti con SCC, con il risultato di una significativa sovrapposizione fra concentrazioni circolanti di PNC misurate in soggetti sani e in pazienti con SCC sintomatico⁹⁶.

Oltre che dall'ampia dispersione delle concentrazioni di BNP nei pazienti con insufficienza cardiaca, il contributo che il BNP fornisce alla diagnosi di SCC viene oscurato dalla sua elevata variabilità biologica intraindividuale nel plasma^{64,65,67}.

Sulla base dell'approccio bayesiano, al fine di massimizzare il valore predittivo negativo dell'esame

(esclusione dello SCC in soggetti sintomatici) sembra opportuno utilizzare livelli decisionali pari al limite superiore di riferimento ottenuto in una popolazione sana con il metodo analitico in uso.

Valutazione iniziale dei pazienti con scompenso cardiaco acuto

Alcuni studi hanno valutato il ruolo diagnostico delle concentrazioni plasmatiche di BNP o NT-proBNP in pazienti con segni e sintomi suggestivi di scompenso cardiaco nella fase di acuzie o di riacutizzazione della sintomatologia. Questi studi sono stati soprattutto eseguiti in dipartimenti di emergenza o pronto soccorso, utilizzando dapprima un metodo "point-of-care" (POCT) per il dosaggio del BNP e più recentemente metodi completamente automatizzati⁹⁷⁻¹¹¹.

Nello studio multicentrico Breathing Not Properly, l'utilizzo di un livello decisionale di BNP pari a 100 ng/l (metodo POCT Biosite) conferiva al test una sensibilità del 90%, una specificità del 76% ed un'accuratezza diagnostica dell'81% per la diagnosi dell'origine cardiaca della dispnea acuta, valori superiori a quelli ottenuti dalla sola valutazione clinica¹⁰³. Un livello decisionale più basso (50 ng/l) forniva una sensibilità del 97%, una specificità del 62%, un valore predittivo positivo del 71% ma soprattutto un valore predittivo negativo del 96%, riconfermando l'utilità del test principalmente per il "rule out" dei pazienti. Inoltre, un'analisi critica dei risultati di questo studio multicentrico fa rilevare l'esistenza di una "zona grigia" di valori del test (nel caso particolare compresi fra 50 e 500 ng/l) in cui la diagnosi differenziale fra scompenso cardiaco ed altre cause di dispnea è impossibile mediante il solo impiego del BNP⁹⁸. In accordo con quanto già detto in precedenza, al fine di un "rule out" dei pazienti sospetti, l'utilizzo di livelli decisionali distinti per età, sesso ed origine etnica non migliorava l'accuratezza diagnostica¹¹⁰.

In un più recente studio prospettico e randomizzato, il dosaggio di BNP migliorava l'efficienza diagnostica e il trattamento di pazienti con dispnea acuta, riducendo significativamente il tempo di ricovero e il costo totale del trattamento¹¹¹. Altri studi hanno confermato che il dosaggio del NT-proBNP può essere soprattutto utile per la diagnosi di esclusione di scompenso cardiaco in pazienti che si presentano al dipartimento di emergenza per dispnea acuta^{108,109}.

Appare quindi evidente, al momento, che il dosaggio dei PNC plasmatici dovrebbe essere eseguito solamente al fine di escludere un'origine cardiaca della sintomatologia dispnoica acuta in pazienti che presentano segni e sintomi che sono ambigui o confondibili con altre patologie (ad esempio, la broncopneumopatia cronica ostruttiva).

Valutazione della disfunzione ventricolare sinistra cronica asintomatica

Vari studi hanno cercato di correlare la concentrazione plasmatica di BNP e la funzione ventricolare sinistra in pazienti con indicazione ad un esame ecocardiografico²⁹. In generale, l'efficienza diagnostica del test era funzione della definizione di diminuita funzione ventricolare e della sua prevalenza nella popolazione valutata. In uno studio, nel quale la prevalenza della disfunzione, definita con una frazione di eiezione del ventricolo sinistro < 45%, era dell'11%, la determinazione del BNP consentiva di identificare i pazienti senza disfunzione ("rule out") con un valore predittivo negativo del 96%¹¹². In un altro studio, una diversa definizione della disfunzione ventricolare (frazione di eiezione < 50% o disfunzione diastolica) ne aumentava naturalmente la prevalenza (47%). In questo contesto, sia la specificità (98%) che la sensibilità (86%) del metodo risultavano buone⁹⁹.

Screening della disfunzione ventricolare asintomatica

Recenti studi di popolazione hanno evidenziato come più della metà delle persone affette da disfunzione ventricolare sistolica o diastolica siano asintomatiche¹¹³⁻¹²⁰. Un test semplice e relativamente economico come il dosaggio del BNP potrebbe essere quindi di grande utilità per identificare i soggetti da sottoporre ad esami strumentali più sofisticati (ad esempio, ecocardiografia).

In una indagine condotta su più di 3000 volontari a Framingham, la determinazione del BNP non è risultata efficace per sostenere una sua utilità clinica nello screening di popolazione¹¹⁴. Questi dati sono stati anche confermati da altri studi¹¹⁸. Risultati migliori erano ottenuti in uno studio retrospettivo condotto su un gruppo di soggetti ad alto rischio selezionati sulla base di criteri clinici (pressione arteriosa elevata e/o elettrocardiogramma anormale)¹¹⁹. In questo gruppo, la conoscenza della concentrazione di BNP avrebbe consentito di ridurre da 17 a 12 il numero di esami ecocardiografici necessari per identificare un caso di disfunzione ventricolare, e quindi di abbassare significativamente il costo dello screening. Questi dati preliminari necessitano tuttavia di conferme da studi prospettici.

Quando la definizione della disfunzione ricercata durante uno screening diventa più ampia (e quindi quando la prevalenza della patologia ricercata aumenta), non limitandosi solamente alla disfunzione ventricolare ma includendo ogni causa di disfunzione cardiaca, il valore diagnostico del BNP nello screening di popolazione appare aumentato, anche se pur sempre principalmente con valore di "rule out"^{120,121}. Mancano tuttavia studi prospettici a conferma di questi dati, che consentano di raccomandare lo screening sistematico

di popolazioni, seppur selezionate, o di sottogruppi di esse, con un significativo beneficio economico per il sistema sanitario.

Guida alla terapia

La riportata relazione fra le concentrazioni plasmatiche di BNP/NT-proBNP e la funzione ventricolare cardiaca ha suscitato la speranza che il monitoraggio del BNP possa aiutare e guidare il cardiologo nel valutare l'efficacia ed ottimizzare la terapia dell'insufficienza cardiaca. Tuttavia, solamente pochi studi preliminari (arruolando finora un numero limitato di pazienti) hanno valutato questa interessante ipotesi di lavoro^{29,76,122-126}.

In uno studio, 20 pazienti con insufficienza cardiaca lieve-moderata erano randomizzati ad una titolazione dell'ACE-inibitore basata su determinazioni successive delle concentrazioni di BNP oppure secondo un approccio clinico tradizionale¹²². Nel gruppo dei pazienti con terapia guidata dal BNP si osservava una riduzione significativa della concentrazione circolante di BNP ed una inibizione più marcata e duratura del sistema renina-angiotensina, a fronte di una minore riduzione della frequenza cardiaca.

In un secondo studio 69 pazienti con funzione sistolica compromessa ed insufficienza cardiaca sintomatica erano trattati secondo un protocollo sequenziale che prevedeva un ACE-inibitore e altri farmaci, e assegnati a una gestione clinica con o senza la conoscenza della concentrazione di NT-proBNP¹²³. Nel braccio dei pazienti monitorati con NT-proBNP, vi era una riduzione del 65% degli eventi cardiovascolari durante un periodo di 9.5 mesi.

Molti studi clinici ed epidemiologici hanno dimostrato una correlazione tra concentrazione dei PNC e ridotta funzione cardiaca, in particolare ridotta funzione ventricolare sinistra sistolica^{4,5}, ma anche ventricolare diastolica e destra, oltre che con età e funzione renale, spiegando la correlazione importante tra concentrazione di BNP, sintomi e prognosi nei pazienti scompensati¹²⁷. Questi dati molto promettenti aspettano ora conferme da studi clinici randomizzati di dimensioni sufficienti. Sebbene le prime evidenze pubblicate siano incoraggianti, alcuni aspetti devono ancora essere chiariti: una certa imprevedibilità nell'effetto dei beta-bloccanti – una terapia di efficacia ormai indiscussa – sulle concentrazioni circolanti di PNC nel paziente con insufficienza cardiaca. Gli effetti contrastanti dei beta-bloccanti sui PNC (riduzione, neutralità o anche aumento) sono forse attribuibili alla durata del trattamento (aumento precoce all'introduzione seguito da progressiva riduzione) ma anche alla selettività farmacologica dei diversi composti^{29,124,128-130}. Inoltre, mentre la concentrazione circolante media di PNC può riflettere la risposta terapeutica in una popolazione relativamente omogenea di pazienti e quindi fungere da

endpoint surrogato in studi clinici, l'uso di questo approccio nel singolo paziente può essere reso delicato dall'elevata variabilità biologica del BNP⁹⁷. In altre parole, per essere interpretate come rilevanti per il monitoraggio di un singolo paziente con insufficienza cardiaca, le differenze di concentrazioni di BNP nel tempo devono essere di un'ampiezza tale da superare l'elevata differenza critica caratteristica di questi marcatori^{64,65,67}.

Considerazioni conclusive

Sono due i principali campi di applicazione del dosaggio del BNP/NT-proBNP immediatamente trasferibili alla pratica clinica:

- esclusione della diagnosi di nuovi casi di insufficienza cardiaca in soggetti valutati dal medico di base (obiettivo: ridurre il numero di visite specialistiche cardiologiche “inutili”);
- diagnosi differenziale di insufficienza cardiaca acuta in pronto soccorso (obiettivo: ridurre i tempi di inizio di trattamenti specifici ed efficaci).

Più remota appare la possibilità che la determinazione dei PNC possa aiutare nella valutazione periodica della stabilità clinica del paziente con insufficienza cardiaca in ambito ambulatoriale o domestico, sul modello del controllo glicemico del paziente diabetico (obiettivo: ridurre il numero di visite specialistiche del paziente ambulatoriale).

RACCOMANDAZIONI 2-8

Raccomandazione 2. È consigliabile eseguire il dosaggio di BNP/NT-proBNP per escludere la diagnosi di scompenso cardiaco in pazienti con diagnosi sospetta, ma con segni e sintomi di presentazione ambigui o che possono essere confusi con altre patologie (come la broncopneumopatia cronica ostruttiva).

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo B.

Raccomandazione 3. È consigliabile eseguire il dosaggio di BNP/NT-proBNP per confermare la diagnosi di scompenso cardiaco in pazienti con diagnosi sospetta, ma con segni e sintomi di presentazione ambigui o che possono essere confusi con altre patologie (come la broncopneumopatia cronica ostruttiva).

Categoria di evidenza: classe IIa.

Livello di evidenza: tipo B.

Raccomandazione 4. Il dosaggio di BNP o NT-proBNP è complementare alla valutazione clinica e strumentale del paziente scompensato, che non sostituisce.

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo C.

Raccomandazione 5. Il dosaggio routinario di BNP o NT-proBNP per pazienti con ovvia diagnosi clinica di scompenso cardiaco non è necessario.

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo C.

Raccomandazione 6. Il dosaggio routinario di BNP o NT-proBNP non è appropriato per lo screening di una disfunzione ventricolare sinistra in popolazioni asintomatiche.

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo C.

Raccomandazione 7. Le concentrazioni plasmatiche di BNP e NT-proBNP possono fornire un valido aiuto nella valutazione clinica di pazienti con SCC in situazioni selezionate, quando è richiesta la stratificazione del rischio.

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo B.

Raccomandazione 8. Il dosaggio routinario di BNP o NT-proBNP non è indicato al fine di assumere decisioni terapeutiche in pazienti con scompenso cardiaco acuto o cronico.

Categoria di evidenza: classe IIb.

Livello di evidenza: tipo B.

PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B E FRAMMENTO AMINOTERMINALE DEL PROPEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B NELLE SINDROMI CORONARICHE ACUTE

I risultati di numerosi studi condotti su più di 12 000 pazienti hanno evidenziato che elevazioni dei PNC sono predittive di morte ed insufficienza cardiaca grave nell'intero spettro dei pazienti con SCA^{26,131-144}. Tali studi hanno dunque suggerito l'impiego clinico del dosaggio dei PNC in questo gruppo di condizioni cliniche.

Concetti di stratificazione del rischio nelle sindromi coronariche acute

La stratificazione precoce del rischio dei pazienti con SCA è fondamentale al fine di concentrare le risorse diagnostiche e terapeutiche sui pazienti a più alto rischio, che per lo più necessitano dell'inizio immediato di un trattamento antitrombotico aggressivo e di una rapida rivascolarizzazione.

Gli strumenti di predizione del rischio (di morte, di eventi ischemici ricorrenti o di insufficienza cardiaca), basati sul rilevamento al momento dell'ingresso di variabili cliniche, elettrocardiografiche e bioumorali (marcatori di danno miocardico, principalmente la troponina), sono relativamente imprecisi. Vi è perciò spazio per nuovi indicatori, in grado di individuare i sog-

getti a rischio che non vengono identificati con gli strumenti tradizionali.

Per essere considerato utile dal punto di vista prognostico un nuovo marcatore biochimico deve possedere una serie di caratteristiche che devono essere accertate prima di considerare il suo utilizzo clinico (valore prognostico indipendente, valore prognostico incrementale rispetto alle variabili prognostiche utilizzate comunemente, facilità e accuratezza di misurazione nell'ambito clinico di interesse, effetto positivo di terapie specifiche iniziate sulla base del riscontro di elevazione del marcatore). L'accertamento di queste caratteristiche prevede un uso ottimale delle variabili prognostiche di base nei confronti delle quali il nuovo marcatore biochimico viene valutato¹⁴⁵.

I peptidi natriuretici cardiaci nell'ischemia miocardica acuta

Elevazioni dei PNC sono riscontrabili nei pazienti con SCA anche in assenza di necrosi miocardica rilevata attraverso la misurazione di marcatori biochimici come la troponina^{26,144,146,147}. È stato dimostrato che le concentrazioni di BNP aumentano dopo angioplastica coronarica, anche in presenza di normali pressioni intracardiache, e durante ischemia miocardica indotta da esercizio fisico^{26,146,147}. Ciò suggerisce che l'ischemia miocardica può indurre rapidamente la sintesi e il rilascio di BNP di entità proporzionale alla gravità dell'ischemia.

Il meccanismo di produzione dei PNC durante ischemia è tuttora sconosciuto, anche se generalmente si ritiene che siano implicati l'aumento regionale dello stiramento delle miofibre e la riduzione locale della contrattilità miocardica^{148,149}. Comunque, alcuni studi hanno suggerito che non solo l'ischemia miocardica, ma che anche l'ipossia possa stimolare direttamente la produzione di BNP nel ventricolo^{26-28,150,151}. È noto che la concentrazione plasmatica del BNP risulta strettamente correlata con la capacità aerobica in pazienti con insufficienza cardiaca¹⁵²⁻¹⁵⁴. Questi risultati potrebbero spiegare l'aumento del BNP in alcuni pazienti con SCA senza significative dilatazioni delle camere ventricolari^{26,150,151}. Secondo questa ipotesi, elevati valori di BNP (o NT-proBNP) potrebbero essere dovuti, almeno in parte, all'attivazione del sistema neuroumorale secondario all'ischemia od ipossia miocardica¹⁴⁷.

Valore prognostico dei peptidi natriuretici cardiaci

I risultati degli studi clinici indicano che elevazioni delle concentrazioni di BNP e NT-proBNP:

- a) sono predittive della mortalità;
- b) sono predittive di manifestazioni gravi di insufficienza cardiaca (edema polmonare e shock);
- c) non sono predittive di eventi ischemici ricorrenti (soprattutto di infarto miocardico non fatale).

Il valore prognostico dell'elevazione dei PNC è indipendente ed incrementale rispetto alle variabili cliniche (età, diabete, scompenso cardiaco pregresso o in atto al momento del ricovero, pressione arteriosa, frequenza cardiaca), elettrocardiografiche (nei pazienti con SCA senza sopraslivellamento del tratto ST) e biochimiche (troponina e proteina C reattiva).

Concentrazioni dei peptidi natriuretici cardiaci nelle sindromi coronariche acute

L'interpretazione del riscontro di elevazione precoce dei PNC è complicata dal fatto che l'entità dell'elevazione è in relazione alla gravità dell'evento ischemico e al tempo trascorso tra inizio dell'episodio ischemico e momento di rilevazione dell'elevazione, dato che le concentrazioni di PNC aumentano progressivamente nelle prime 24 ore dall'episodio ischemico acuto^{148,150}. È stato evidenziato che i pazienti con infarto miocardico con sopraslivellamento del tratto ST mostrano concentrazioni più elevate dei pazienti con infarto miocardico senza sopraslivellamento del tratto ST e che questi ultimi evidenziano concentrazioni dei PNC maggiori dei pazienti con angina instabile^{131-133,136,151,155}. Le concentrazioni dei PNC sono risultate correlate con l'estensione della coronaropatia^{156,157}.

In base a queste considerazioni è intuitivamente difficile identificare un unico livello decisionale in grado di esprimere tutto il potenziale di rischio derivante dal riscontro dell'elevazione. In una recente metanalisi, sono state riportate le mediane delle concentrazioni, dai risultati pubblicati nei maggiori studi sul valore prognostico dei PNC nei pazienti con SCA, con riferimento ai risultati alla popolazione specifica in cui il marcatore è stato studiato¹⁴⁸. Ovviamente tale tipo di analisi non è utile ad individuare livelli decisionali utilizzabili in generale nella pratica clinica e quindi ogni laboratorio ed equipe clinica dovrebbe valutare quali livelli decisionali adottare nel proprio contesto seguendo la letteratura scientifica o, meglio, utilizzando studi clinici specificatamente effettuati nel proprio contesto.

Valore prognostico sulla mortalità a breve e lungo termine

I risultati della già citata metanalisi mostrano che il valore prognostico di BNP e NT-proBNP è simile sia a breve (< 1 mese: odds ratio-OR 3.38, intervallo di confidenza-IC 95% 2.44-4.68) che a lungo termine (< 10 mesi: OR 4.31, IC 95% 3.77-4.94)¹⁴⁸. Questa osservazione ha valore pratico dal momento che la dimostrazione di un valore prognostico anche a breve termine (l'impatto prognostico a lungo termine era stato già dimostrato nei primi studi sui pazienti con infarto miocardico in cui le concentrazioni dei PNC erano misurate nella fase subacuta) giustifica sforzi di ricerca volti

ad individuare interventi terapeutici specifici da applicare ai pazienti con elevazioni precoci di BNP o NT-proBNP.

Valore prognostico in funzione del momento della misurazione

I risultati della metanalisi mostrano anche che l'impatto prognostico della misurazione delle concentrazioni dei PNC è sovrapponibile sia nel caso in cui le concentrazioni vengano misurate al ricovero del paziente (OR 4.42, IC 95% 3.83-5.10), sia quando la misurazione venga effettuata nei giorni successivi (OR 3.51, IC 95% 2.64-4.67)¹⁴⁸. La conferma del valore prognostico della misurazione precoce indirizza verso la necessità di individuare trattamenti che, applicati acutamente ai pazienti con elevazione dei PNC, siano in grado di influenzare favorevolmente la prognosi.

Strategie terapeutiche basate sulle concentrazioni dei peptidi natriuretici cardiaci

Due studi hanno valutato l'effetto della strategia precocemente invasiva nei pazienti con SCA non associata a sopraslivellamento del tratto ST e concentrazioni elevate di PNC^{141,158}. Tuttavia, i risultati ottenuti sono apparentemente contraddittori.

Morrow et al.¹⁴¹ hanno retrospettivamente analizzato i pazienti del TACTICS-TIMI 18 e osservato che quelli con elevazione di BNP avevano a 6 mesi la stessa mortalità sia che fossero stati assegnati alla strategia precocemente invasiva che a quella conservativa.

Jernberg et al.¹⁵⁸ hanno studiato retrospettivamente i pazienti del FRISC-II ed osservato che coloro che mostravano le concentrazioni plasmatiche di NT-proBNP più elevate in associazione con segni di infiammazione sistemica (definiti in base all'elevazione di interleuchina-6) traevano beneficio della strategia invasiva. La mortalità a 2 anni dei pazienti con questo "profilo bioumorale" era ridotta del 50% (rischio relativo 0.46, IC 95% 0.21-1.00) con la procedura più aggressiva.

Le ragioni per tali differenze non sono attualmente chiare e potrebbero essere molteplici; si rimanda altrove per una discussione più dettagliata^{148,159}. Di fatto, al momento attuale non vi è evidenza sufficiente per indicare quale strategia terapeutica, farmacologica o interventistica, sia di particolare beneficio nei pazienti con SCA, che presentino un'elevazione dei PNC.

RACCOMANDAZIONI 9-10

Raccomandazione 9. La determinazione di BNP/NT-proBNP è utile per precisare il profilo di rischio di morte a breve e a lungo termine nei pazienti con SCA, soprattutto in coloro che si presentano senza segni di

scompenso cardiaco in atto o pregresso o con troponina inizialmente negativa.

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo A.

Raccomandazione 10. La determinazione di BNP o NT-proBNP deve essere effettuata al momento del ricovero in ogni paziente con SCA accertata in base a valutazione clinica ed elettrocardiogramma.

Categoria di evidenza: classe IIa.

Livello di evidenza: tipo B.

APPENDICE I

Nomenclatura e abbreviazioni

- *Pre-propeptide natriuretico di tipo B (pre-proBNP)*: prodotto codificato a livello genetico, costituito da 134 aminoacidi.
- *Propeptide natriuretico di tipo B (proBNP)*: ha origine per il distacco di un peptide segnale di 26 aminoacidi dal pre-proBNP, configurandosi in proBNP (aminoacidi 1-108). È presente sia nel miocardiocita sia, in misura minore, nel plasma.
- *Peptide natriuretico di tipo B (BNP)*: molecola biologicamente attiva (ormone) composta dal frammento carbossiterminale del proBNP (aminoacidi 77-108). Presente sia nel miocardio sia nel plasma.
- *Frammento aminoterminale del propeptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP)*: corrispondente al frammento aminoterminale (aminoacidi 1-76) del proBNP, sembra non possedere attività ormonale. È rilevabile sia nel circolo sanguigno sia nel miocardio. Con la stessa sigla vengono a volte anche identificati ulteriori prodotti di degradazione/scissione di questa molecola [ad esempio NT-proBNP (aminoacidi 1-21)], dei quali però poco si conosce sia in termini metabolici che fisiopatologici.
- Analogamente si definiscono i peptidi della famiglia del peptide natriuretico di tipo A (ANP): pre-proANP, proANP, NT-proANP.

APPENDICE II

Livelli decisionali

Premessa. Il comitato di esperti ha ritenuto di non dover raccomandare ufficialmente specifici livelli decisionali (cut-off) per i seguenti motivi:

- a) i metodi di dosaggio del BNP e del NT-proBNP disponibili mostrano differenti specificità immunologiche e valori di riferimento (Tab. III)^{29,55-58,159-164};
- b) i cut-off ottimali, spesso ottenuti dalle analisi delle curve ROC (valore corrispondente al valore massimo della somma specificità + sensibilità), non solo dipendono dal tipo di peptidi misurati (ANP o NT-proANP, BNP o NT-proBNP) e dai rispettivi metodi di dosaggio utilizzati, ma anche:
 - dal "gold standard" utilizzato per classificare le risposte (positive/negative, vere/false) dell'esame di laboratorio;
 - dalla condizione clinica in cui si testa l'accuratezza diagnostica;
 - dalla prevalenza di malattia nel contesto studiato;
 - dalla gravità e severità della patologia nei pazienti considerati;
 - dal tipo di interpretazione dell'analisi statistica utilizzata²⁹.

Per questi motivi appare impossibile raccomandare singoli livelli decisionali (cut-off) che possano essere utilizzati in ogni condizione clinica. Tuttavia, si ritiene di poter suggerire alcuni

valori puramente indicativi, riportando soltanto i dati relativi a metodi di dosaggio di cui sono disponibili più evidenze in letteratura e sottolineandone altresì le possibili limitazioni cliniche.

Diagnosi di esclusione dello scompenso cardiaco. Come riportato nella Raccomandazione 2, è principalmente consigliato eseguire il dosaggio dei PNC per escludere la diagnosi di insufficienza cardiaca in pazienti con tale sospetto clinico. Per far ciò, deve essere stabilita una concentrazione di PNC al di sotto della quale è assai improbabile che il paziente abbia una insufficienza cardiaca alla base dei suoi sintomi. Il valore prescelto deve avere quindi gradi di sensibilità clinica e di valore predittivo negativo > 95%¹⁶⁵.

Impiego del peptide natriuretico di tipo B. I metodi di dosaggio di cui si dispone di un maggior numero di dati relativi alla diagnostica dello scompenso cardiaco sintomatico sono il dosaggio IRMA (Shionogi), utilizzato fin dall'inizio degli anni '90 per la diagnosi di insufficienza cardiaca²⁹, e la metodica POCT Triage (Biosite Diagnostics), la cui utilità è basata soprattutto sugli studi dei Ricercatori del Breathing Not Properly Multinational Study, che hanno valutato più volte lo stesso gruppo di pazienti, suddividendolo di volta in volta in differenti sottogruppi^{99,103,104,106,107,110}. Non vi sono attualmente osservazioni sufficienti per i metodi di dosaggio del BNP resi disponibili più recentemente (Abbott AxSYM, Bayer ADVIA e Beckman Access).

Per applicare correttamente la regola di esclusione sembra più appropriato un valore che si avvicini (o che sia appena inferiore) al 97.5° percentile della distribuzione dei valori nei soggetti sani. In accordo con i dati riportati in tabella III, un valore < 50 ng/l, potrebbe essere utilizzato, per i metodi IRMA, POCT Triage ed ADVIA Centaur, mentre valori più elevati dovrebbero essere utilizzati per il sistema MEIA AxSYM. È importante notare come lo studio Breathing Not Properly presentasse una sensibilità media del 97% ed un valore predittivo negativo del 96% per un valore corrispondente a 50 ng/l¹⁰³.

Impiego del frammento aminoterminale del propeptide natriuretico di tipo B. Per quanto concerne il dosaggio di NT-proBNP, l'unico metodo commercialmente disponibile è quello ECLIA (Roche). È infatti da troppo poco tempo disponibile il metodo per il sistema Dimension (Dade-Behring), che utilizza gli stessi anticorpi e calibratori del metodo ECLIA, per poter disporre di dati pubblicati. Necessita qui ricordare che la maggior parte degli studi presenti in letteratura hanno utilizzato metodi che manuali per il dosaggio dei peptidi correlati alla porzione NT-proBNP non facilmente applicabili alla routine clinica^{21,105,123,124,127,135,138}.

Analogamente a quanto riportato per il dosaggio del BNP, potrebbe essere utilizzato come livello decisionale per il NT-proBNP, per escludere la diagnosi di scompenso cardiaco, un valore vicino al 97.5° percentile della distribuzione dei valori nei soggetti sani. Tale valore, utilizzando sia i dati presenti in letteratura, che quelli riportati nella tabella III, potrebbe essere indicato in 150 ng/l.

Valore prognostico nei pazienti con sindrome coronarica acuta. Risulta molto difficile suggerire un singolo livello decisionale per la valutazione del rischio nei pazienti con SCA perché il rischio aumenta in modo continuo (anche se non sempre linearmente) con l'aumento delle concentrazioni di PNC¹⁶⁶.

Generalmente, gli autori dividono i pazienti in gruppi a seconda della concentrazione dei PNC (ad esempio, utilizzando i quartili) ed analizzano il rischio separatamente per ciascun gruppo. Evidentemente, i pazienti dei gruppi con concentrazioni di BNP più elevate presentano anche un rischio più elevato di mortalità o di altri eventi cardiaci.

A livello puramente indicativo, si può osservare come i dati riportati nella letteratura suggeriscano che concentrazioni del peptide (BNP o NT-proBNP) superiori al doppio del limite superiore della distribuzione di riferimento sembrano generalmente possedere un valore predittivo indipendente ed indicare un rischio significativo di mortalità.

RIEPILOGO DELLE RACCOMANDAZIONI

Raccomandazione 1. Tutti i nuovi test proposti dovrebbero essere valutati prima del loro utilizzo clinico, per le seguenti caratteristiche analitiche e preanalitiche:

- tipo di antigene utilizzato come calibratore;
- specificità anticorpale e identificazione dei relativi epitopi;
- crossreattività con tutte le molecole affini presenti nel plasma, a cominciare dal proBNP (aminoacidi 1-108);
- interferenze relative a:
 - principali interferenti endogeni,
 - principali tipi di campione biologico (siero, plasma con diffe-
- tipo di provetta utilizzata per il prelievo,
- stabilità del campione alle varie temperature di conservazione.

Livello di raccomandazione: classe I.

Livello di evidenza: tipo C.

Raccomandazione 2. È consigliabile eseguire il dosaggio di BNP/NT-proBNP per escludere la diagnosi di scompenso cardiaco in pazienti con diagnosi sospetta, ma con segni e sintomi di presentazione ambigui o che possono essere confusi con altre patologie (come la broncopneumopatia cronica ostruttiva).

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo B.

Raccomandazione 3. È consigliabile eseguire il dosaggio di BNP/NT-proBNP per confermare la diagnosi di scompenso cardiaco in pazienti con diagnosi sospetta, ma con segni e sintomi di presentazione ambigui o che possono essere confusi con altre patologie (come la broncopneumopatia cronica ostruttiva).

Categoria di evidenza: classe IIa.

Livello di evidenza: tipo B.

Raccomandazione 4. Il dosaggio di BNP o NT-proBNP è complementare alla valutazione clinica e strumentale del paziente scompensato, che non sostituisce.

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo C.

Raccomandazione 5. Il dosaggio routinario di BNP o NT-proBNP per pazienti con ovvia diagnosi clinica di scompenso cardiaco non è necessario.

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo C.

Raccomandazione 6. Il dosaggio routinario di BNP o NT-proBNP non è appropriato per lo screening di una disfunzione ventricolare sinistra in popolazioni asintomatiche.

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo C.

Raccomandazione 7. Le concentrazioni plasmatiche di BNP e NT-proBNP possono fornire un valido aiuto nella valutazione clinica di pazienti con SCC in situazioni selezionate, quando è richiesta la stratificazione del rischio.

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo B.

Raccomandazione 8. Il dosaggio routinario di BNP o NT-proBNP non è indicato al fine di assumere decisioni terapeutiche in pazienti con scompenso cardiaco acuto o cronico.

Categoria di evidenza: classe IIb.

Livello di evidenza: tipo B.

Raccomandazione 9. La determinazione di BNP/NT-proBNP è utile per precisare il profilo di rischio di morte a breve e a lungo termine nei pazienti con SCA, soprattutto in coloro che si presentano senza segni di scompenso cardiaco in atto o pregresso o con troponina inizialmente negativa.

Categoria di evidenza: classe I.

Livello di evidenza: tipo A.

Raccomandazione 10. La determinazione di BNP o NT-proBNP deve essere effettuata al momento del ricovero in ogni paziente con SCA accertata in base a valutazione clinica ed elettrocardiogramma.

Categoria di evidenza: classe IIa.

Livello di evidenza: tipo B.

BIBLIOGRAFIA

1. A report of the European Society of Cardiology. Recommendations for Task Force Creation and Report Production. Revised July 25, 2003, 1-16. http://www.escardio.org/initiatives/guidelines/guid_dev_overview.htm
2. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, et al. ACC/AHA guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction – 2002: summary article. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the management of patients with unstable angina). *Circulation* 2002; 106: 1893-900.
3. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined - a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 959-69.
4. Hunt SA, Baker DW, Chin MH, et al. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 guidelines for the evaluation and management of heart failure). *Circulation* 2001; 104: 2996-3007, *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 2101-13.
5. Remme WJ, Swedberg K, on behalf of the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J* 2001; 22: 1527-60.
6. National Institute for Clinical Excellence. Clinical guideline 5. Chronic heart failure. Management of chronic heart failure in adults in primary and secondary care. London, 2003: 1-44.
7. Pulignano G, Del Sindaco D, Tavazzi L, et al, for the IN-CHF Investigators. Clinical features and outcomes of elderly outpatients with heart failure followed up in hospital cardiology units: data from a large nationwide cardiology database (IN-CHF Registry). *Am Heart J* 2002; 143: 45-55.
8. Kirsh B. Electronmicroscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg* 1956; 14: 99-112.
9. Jamieson JD, Palade GE. Specific granules in atrial muscle cell. *J Cell Biol* 1964; 23: 151-62.

10. De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and important natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci* 1981; 28: 89-94.
11. de Bold AJ, Bruneau BG. Natriuretic peptides. In: Fray JC, ed. *Handbook of physiology*. Section 7, Volume III. Oxford: Oxford University Press, 2000: 377-409.
12. de Bold AJ, Ma KK, Zhang Y, de Bold ML, Bensimon M, Khoshbaten A. The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79: 705-14.
13. Clerico A. Pathophysiological and clinical relevance of circulating levels of cardiac natriuretic hormones: is their assay merely a marker of cardiac disease? *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 752-60.
14. Scardovi AB. Clinical applications of brain natriuretic peptide testing. *Ital Heart J Suppl* 2004; 5: 343-56.
15. de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003; 362: 316-22.
16. Richards AM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Cameron AV, Yandle TG. Dendroaspis natriuretic peptide: endogenous or dubious? *Lancet* 2002; 359: 5-6.
17. Belenky A, Smith A, Zhang B, et al. The effect of class-specific protease inhibitors on the stabilization of B-type natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chim Acta* 2004; 340: 163-72.
18. Shimizu H, Masuta K, Aono K, et al. Molecular forms of human brain natriuretic peptide in plasma. *Clin Chim Acta* 2002; 316: 129-35.
19. Shimizu H, Masuta K, Asada H, Sugita K, Sairenji T. Characterization of molecular forms of probrain natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chim Acta* 2003; 334: 233-9.
20. Goetze JP. Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: the endocrine heart revisited. *Clin Chem* 2004; 50: 1503-10.
21. Hunt PJ, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM, Yandle TG. The role of the circulation in processing pro-brain natriuretic peptide (proBNP) to amino-terminal BNP and BNP-32. *Peptides* 1997; 18: 1475-81.
22. Nicolau N, Butur G, Laky D. Electronmicroscopic observations regarding the presence of natriuretic granules in the ventricle of patients with cardiopathies. *Rom J Morphol Embryol* 1997; 43: 119-37.
23. Hasegawa K, Fujiwara H, Doyama K, et al. Ventricular expression of atrial and brain natriuretic peptides in dilated cardiomyopathy. An immunohistochemical study of the endomyocardial biopsy specimens using specific monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1993; 142: 107-16.
24. Sakata Y, Yamamoto K, Masuyama T, et al. Ventricular production of natriuretic peptides and ventricular structural remodeling in hypertensive heart failure. *J Hypertens* 2001; 19: 1905-9.
25. Walther T, Klostermann K, Hering-Walther S, Schultheiss HP, Tschope C, Stepan H. Fibrosis rather than blood pressure determines cardiac BNP expression in mice. *Regul Pept* 2003; 116: 95-100.
26. de Lemos JA, Morrow DA. Brain natriuretic peptide measurement in acute coronary syndromes: ready for clinical application? *Circulation* 2002; 106: 2868-70.
27. Hama N, Itoh H, Shirakami G, et al. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; 92: 1158-64.
28. Toth M, Vuorinen KH, Vuolteenaho O, et al. Hypoxia stimulates release of ANP and BNP from perfused rat ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1994; 266 (Part 2): H1572-H1580.
29. Clerico A, Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of the cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin Chem* 2004; 50: 33-50.
30. Marumoto K, Hamada M, Hiwada K. Increased secretion of atrial and brain natriuretic peptides during acute myocardial ischaemia induced by dynamic exercise in patients with angina pectoris. *Clin Sci (Colch)* 1995; 88: 551-6.
31. Tateishi J, Masutani M, Ohyanagi M, et al. Transient increase in plasma brain (B-type) natriuretic peptide after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Clin Cardiol* 2000; 23: 776-80.
32. Kuroski de Bold ML. Estrogen, natriuretic peptides and the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 524-31.
33. Maffei S, Del Ry S, Prontera C, Clerico A. Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Clin Sci* 2001; 101: 447-53.
34. Tanaka T, Kanda T, Takahashi T, Saegusa S, Moriya J, Kurabayashi M. Interleukin-6-induced reciprocal expression of SERCA and natriuretic peptides mRNA in cultured rat ventricular myocytes. *J Int Med Res* 2004; 32: 57-61.
35. Withaut R, Busch C, Fraunberger P, et al. Plasma atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are increased in septic shock: impact of interleukin-6 and sepsis-associated left ventricular dysfunction. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1696-702.
36. Hiraoka E, Kawashima S, Takahashi T, Rikitake Y, Hirase T, Yokoyama M. PI 3-kinase-Akt-p70 S6 kinase in hypertrophic responses to leukemia inhibitory factor in cardiac myocytes. *Kobe J Med Sci* 2003; 49: 25-37.
37. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats*. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 329-40.
38. Hamanaka I, Saito Y, Nishikimi T, et al. Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and endocrine function of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H388-H396.
39. Takahashi N, Saito Y, Kuwahara K, et al. Angiotensin II-induced ventricular hypertrophy and extracellular signal-regulated kinase activation are suppressed in mice overexpressing brain natriuretic peptide in circulation. *Hypertens Res* 2003; 26: 847-53.
40. Ma KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36: 505-13.
41. Tsukagoshi H, Shimizu Y, Kawata T, et al. Atrial natriuretic peptide inhibits tumor necrosis factor-alpha production by interferon-gamma-activated macrophages via suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B activation. *Regul Pept* 2001; 99: 21-9.
42. Kierner AK, Weber NC, Furst R, Bildner N, Kulhanek-Heinze S, Vollmar AM. Inhibition of p38 MAPK activation via induction of MKP-1 atrial natriuretic peptide reduces TNF-alpha-induced actin polymerization and endothelial permeability. *Circ Res* 2002; 90: 874-81.
43. Kierner AK, Lehner MD, Hartung T, Vollmar AM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. *Endocrinology* 2002; 143: 846-52.
44. Weber NC, Blumenthal SB, Hartung T, Vollmar AM, Kierner AK. ANP inhibits TNF-alpha-induced endothelial MCP-1 expression-involvement of p38 MAPK and MKP-1. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 932-41.
45. Kapoun AM, Liang F, O'Young G, et al. B-type natriuretic

- peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res* 2004; 94: 453-61.
46. Chen HH, Burnett JC Jr. C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 (Suppl 3): S22-S28.
47. Morishige K, Shimokawa H, Yamawaki T, et al. Local adenovirus-mediated transfer of C-type natriuretic peptide suppresses vascular remodeling in porcine coronary arteries in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1040-7.
48. Takeuchi H, Ohmori K, Kondo I, et al. Potentiation of C-type natriuretic peptide with ultrasound and microbubbles to prevent neointimal formation after vascular injury in rats. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 231-8.
49. Yasuda S, Kanna M, Sakuragi S, et al. Local delivery of single low-dose of C-type natriuretic peptide, an endogenous vascular modulator, inhibits neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39: 784-8.
50. Qian JY, Haruno A, Asada Y, et al. Local expression of C-type natriuretic peptide suppresses inflammation, eliminates shear stress-induced thrombosis, and prevents neointima formation through enhanced nitric oxide production in rabbit injured carotid arteries. *Circ Res* 2002; 91: 1063-9.
51. Emdin M, Passino C, Prontera C, et al. Cardiac natriuretic hormones, neuro-hormones, thyroid hormones and cytokines in normal subjects and patients with heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 627-36.
52. Clerico A, Del Ry S, Maffei S, Prontera C, Emdin M, Giannessi D. The circulating levels of cardiac natriuretic hormones in healthy adults: effects of age and sex. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 371-7.
53. Seidler T, Pemberton C, Yandle T, et al. The amino terminal regions of proBNP and proANP oligomerise through leucine zipper-like coiled-coil motifs. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 495-501.
54. Pagani F, Panteghini M. La determinazione del BNP: peptidi e propeptidi. *Ligand Assay* 2003; 8: 9-14.
55. Panteghini M, Clerico A. Understanding the clinical biochemistry of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: the prerequisite for its optimal clinical use. *Clin Lab* 2004; 50: 325-31.
56. Goetze JP, Kastrup J, Pedersen F, Rehfeld JF. Quantification of pro-B-type natriuretic peptide and its products in human plasma by use of an analysis independent of precursor processing. *Clin Chem* 2002; 48: 1035-42.
57. Clerico A, Del Ry S, Giannessi D. Measurement of natriuretic cardiac hormones (ANP, BNP, and related peptides) in clinical practice: the need for a new generation of immunoassay methods. *Clin Chem* 2000; 46: 1529-34.
58. Clerico A, Prontera C, Emdin M, et al. Analytical performance and diagnostic accuracy of immunometric assays for the measurement of plasma B-type natriuretic peptide and N-terminal proBNP. *Clin Chem* 2005; 51: 445-7.
59. Wu AH, Packer M, Smith A, et al. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study. *Clin Chem* 2004; 50: 867-73.
60. Collinson PO, Barnes SC, Gaze DC, Galasko G, Lahiri A, Senior R. Analytical performance of the N terminal pro B type natriuretic peptide (NT-proBNP) assay on the Elecsys 1010 and 2010 analysers. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 365-8.
61. Shimizu H, Aono K, Masuta K, Asada H, Misaki A, Teraoka H. Degradation of human brain natriuretic peptide (BNP) by contact activation of blood coagulation system. *Clin Chim Acta* 2001; 305: 181-6.
62. Dasgupta A, Chow L, Tso G, Nazareno L. Stability of NT-proBNP in serum specimens collected in Becton Dickinson Vacutainer (SST) tubes. *Clin Chem* 2003; 49 (Part 1): 958-60.
63. Yeo KT, Wu AH, Apple FS, et al. Multicenter evaluation of the Roche NT-proBNP assay and comparison to the Biosite Triage BNP assay. *Clin Chim Acta* 2003; 338: 107-15.
64. Pagani F, Stefini F, Panteghini M. Biological variation in serum concentrations of N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP). (abstr) *Clin Chem* 2003; 49: A34.
65. Wu AH, Smith A, Wiecezorek S, et al. Biological variation for N-terminal pro- and B-type natriuretic peptides and implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2003; 92: 628-31.
66. Harris EK. Effects of intra- and inter-individual variation on the appropriate use of normal range. *Clin Chem* 1974; 20: 1535-42.
67. Wu AH, Smith A. Biological variation of the natriuretic peptides and their role in monitoring patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 355-8.
68. Cotlove E, Harris EK, Williams GZ. Biological and analytical components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. III. Physiological and medical implications. *Clin Chem* 1970; 16: 1028-32.
69. Givertz MM, Colucci WS, Braunwald E. Clinical aspects of heart failure: high output failure; pulmonary edema. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, eds. *Heart diseases*. 6th edition. Philadelphia, PA: WB Saunders, 2001: 534-5.
70. Cowie MR, Mendez GF. BNP and congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 44: 293-321.
71. Latini R, Masson S, de Angelis N, Anand I. Role of brain natriuretic peptide in the diagnosis and management of heart failure: current concepts. *J Card Fail* 2002; 8: 288-99.
72. Caldwell MA, Howie JN, Dracup K. BNP as discharge criteria for heart failure. *J Card Fail* 2003; 9: 416-22.
73. Cardarelli R, Lumicao TG Jr. B-type natriuretic peptide: a review of its diagnostic, prognostic, and therapeutic monitoring value in heart failure for primary care physicians. *J Am Board Fam Pract* 2003; 16: 327-33.
74. Dyrbye L, Redfield MM. The role of brain natriuretic peptide in population screening. *Heart Fail Rev* 2003; 8: 349-54.
75. Howie JN, Caldwell MA, Dracup K. The measurement of brain natriuretic peptide in heart failure: precision, accuracy, and implications for practice. *AACN Clin Issues* 2003; 14: 520-31.
76. Maisel AS. Use of BNP levels in monitoring hospitalized heart failure patients with heart failure. *Heart Fail Rev* 2003; 8: 339-44.
77. Abassi Z, Karram T, Ellaham S, Winaver J, Hoffman A. Implications of the natriuretic peptide system in the pathogenesis of heart failure: diagnostic and therapeutic importance. *Pharmacol Ther* 2004; 102: 223-41.
78. McDonagh TA, Holmer S, Raymond I, Luchner A, Hildebrandt P, Dargie HJ. NT-proBNP and the diagnosis of heart failure: a pooled analysis of three European epidemiological studies. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 269-73.
79. Rodeheffer R. Measuring plasma B-type natriuretic peptide in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 740-9.
80. Gottlieb SS, Kukin ML, Ahern D, Packer M. Prognostic importance of atrial natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 1534-9.
81. Koglin J, Pehlivanli S, Schwaiblmair M, Vogeser M, Cramer P, vonScheidt W. Role of brain natriuretic peptide in risk stratification of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1934-41.
82. Selvais PL, Donckier JE, Robert A, et al. Cardiac natriuretic peptides for diagnosis and risk stratification in heart failure: influences of left ventricular dysfunction and coronary artery disease on cardiac hormonal activation. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 636-42.

83. Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 1990; 82: 1730-6.
84. Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, et al, for the Val-HeFT Investigators. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Val-sartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2003; 107: 1278-83.
85. Latini R, Masson S, Anand I, et al, for the Val-HeFT Investigators. The comparative prognostic value of plasma neurohormones at baseline in patients with heart failure enrolled in Val-HeFT. *Eur Heart J* 2004; 25: 292-9.
86. Hartmann F, Packer M, Coats AJ, et al. Prognostic impact of plasma N-terminal pro-BNP natriuretic peptide in severe chronic congestive heart failure. A substudy of the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) Trial. *Circulation* 2004; 110: 1780-6.
87. Latini R, Wong M, Masson S, et al, for the Val-HeFT Investigators. Predicting outcomes in chronic heart failure from short-term changes in BNP as a surrogate end-point: Val-HeFT data. (abstr) *Circulation* 2003; 108: IV557-IV558.
88. Bettencourt P, Frieos F, Azevedo A, et al. Prognostic information provided by serial measurements of brain natriuretic peptide in heart failure. *Int J Cardiol* 2004; 93: 45-8.
89. Doust JA, Glasziou PP, Pietrzak E, Dobson AJ. A systematic review of the diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1978-84.
90. Raymond I, Groenning BA, Hildebrandt PR, et al. The influence of age, sex and other variables on the plasma levels of N-terminal pro brain natriuretic peptide in a large sample of the general population. *Heart* 2003; 89: 745-51.
91. Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC Jr. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 976-82.
92. Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults. *Am J Cardiol* 2002; 90: 254-8.
93. Wang TJ, Larson MG, Levy D. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 2004; 109: 594-600.
94. Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. Heritability and genetic linkage of plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 2003; 108: 13-6.
95. McCullough PA, Duc P, Omland T, et al, for the Breathing Not Properly Multinational Study Investigators. B-type natriuretic peptide and renal function in the diagnosis of heart failure: an analysis from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 571-9.
96. Tang WH, Girod JP, Lee MJ, et al. Plasma B-type natriuretic peptide levels in ambulatory patients with established chronic symptomatic systolic heart failure. *Circulation* 2003; 108: 2964-6.
97. Gibler WB, Blomkalns AL, Collins SP. Evaluation of chest pain and heart failure in the emergency department: impact of multimarker strategies and B-type natriuretic peptide. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4 (Suppl 4): S47-S55.
98. Maisel AS. The diagnosis of acute congestive heart failure: role of BNP measurements. *Heart Fail Rev* 2003; 8: 327-34.
99. Maisel AS, Koon J, Krishnaswamy P, et al. Utility of B-natriuretic peptide as a rapid, point-of-care test for screening patients undergoing echocardiography to determine left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 2001; 141: 367-74.
100. Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, et al. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 379-85.
101. McCullough PA, Nowak RM, McCord J, et al. B-type natriuretic peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of heart failure: analysis from Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study. *Circulation* 2002; 106: 416-22.
102. McCullough PA, Nowak RM, Foreback C, et al. Performance of multiple cardiac biomarkers measured in the emergency department in patients with chronic kidney disease and chest pain. *Acad Emerg Med* 2002; 9: 1389-96.
103. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al, for the Breathing Not Properly Multinational Study Investigators. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 161-7.
104. Morrison LK, Harrison A, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Maisel A. Utility of a rapid B-natriuretic peptide assay in differentiating congestive heart failure from lung disease in patients presenting with dyspnea. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 202-9.
105. Lainchbury JG, Campbell E, Frampton CM, Yandle TG, Nicholls MG, Richards AM. BNP and N-terminal brain natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure in patients with acute shortness of breath. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 728-35.
106. McCullough PA, Hollander JE, Nowak RM, et al. Uncovering heart failure in patients with a history of pulmonary disease: rationale for the early use of B-type natriuretic peptide in the emergency department. *Acad Emerg Med* 2003; 10: 198-204.
107. Maisel AS, McCord J, Nowak RM, et al. Bedside B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2010-7.
108. Bayes-Genis A, Santalo-Bel M, Zapico-Muniz E, et al. N-terminal probrain natriuretic peptide (NT-proBNP) in the emergency diagnosis and in-hospital monitoring of patients with dyspnoea and ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 301-8.
109. Knudsen CW, Omland T, Clopton P, et al. Diagnostic value of B-type natriuretic peptide and chest radiographic findings in patients with acute dyspnea. *Am J Med* 2004; 116: 363-8.
110. Maisel AS, Clopton P, Krishnaswamy P, et al. Impact of age, race, and sex on the ability of B-type natriuretic peptide to aid in the emergency diagnosis of heart failure: results from the Breathing Not Properly (BNP) multinational study. *Am Heart J* 2004; 147: 1078-84.
111. Mueller C, Scholer A, Laule-Kilian K, et al. Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea. *N Engl J Med* 2004; 350: 647-54.
112. Yamamoto K, Burnett JC Jr, Bermudez EA, Jougasaki M, Bailey KR, Redfield MM. Clinical criteria and biochemical markers for the detection of systolic dysfunction. *J Card Fail* 2000; 6: 194-200.
113. Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, et al. Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 2002; 105: 595-601.
114. Vasan RS, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Plasma natriuretic peptides for community screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction: the Framingham Heart Study. *JAMA* 2002; 288: 1252-9.
115. McDonagh TA, Morrison CE, Lawrence A, et al. Symptomatic and asymptomatic left ventricular dysfunction in an urban population. *Lancet* 1997; 350: 829-33.
116. Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, et al. A population-based assessment of left ventricular systolic dysfunction in

- middle-aged and older adults: the Strong Heart Study. *Am Heart J* 2001; 141: 439-46.
117. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC Jr, Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* 2003; 289: 194-202.
118. Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC Jr. Plasma brain natriuretic peptide to detect pre-clinical ventricular systolic or diastolic dysfunction: a community-based study. *Circulation* 2004; 109: 3176-81.
119. Nielsen OW, McDonagh TA, Robb SD, Dargie HJ. Retrospective analysis of the cost-effectiveness of using plasma brain natriuretic peptide in screening for left ventricular systolic dysfunction in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 113-20.
120. Nakamura M, Endo H, Nasu M, Arakawa N, Segawa T, Hiramori K. Value of plasma B type natriuretic peptide measurement for heart disease screening in a Japanese population. *Heart* 2002; 87: 131-5.
121. Niinuma H, Nakamura M, Hiramori K. Plasma B-type natriuretic peptide measurement in a multiphasic screening programme. *Cardiology* 1998; 90: 89-94.
122. Murdoch DR, McDonagh TA, Byrne J, et al. Titration of vasodilator therapy in chronic heart failure according to plasma brain natriuretic concentration: randomized comparison of the neuroendocrine effects of tailored versus empirical therapy. *Am Heart J* 1999; 138: 1126-32.
123. Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000; 355: 1126-30.
124. Richards AM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Troughton RW, Yandle TG. BNP in hormone-guided treatment of heart failure. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 151-5.
125. Richards AM, Troughton RW. NT-proBNP in heart failure: therapy decision and monitoring. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 351-4.
126. Bettencourt P. NT-proBNP and BNP: biomarkers for heart failure management. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 359-63.
127. Troughton RW, Prior DL, Pereira JJ, et al. Plasma B-type natriuretic peptide levels in systolic heart failure: importance of left ventricular diastolic function and right ventricular systolic function. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 416-22.
128. Baran D, Horn EM, Hryniewicz K, Katz SD. Effects of beta-blockers on neurohormonal activation in patients with congestive heart failure. *Drugs* 2000; 60: 997-1016.
129. The Randomized Evaluation of Strategies for Left Ventricular Dysfunction (RESOLVD) Investigators. Effects of metoprolol CR in patients with ischemic and dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 101: 378-84.
130. Yoshizawa A, Yoshikawa T, Nakamura I, et al. Brain natriuretic peptide response is heterogeneous during beta-blocker therapy for congestive heart failure. *J Card Fail* 2004; 10: 310-5.
131. Arakawa N, Nakamura M, Aoki H, Hiramori K. Plasma brain natriuretic peptide concentrations predict survival after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1656-61.
132. Omland T, Aakvaag A, Bonarjee VV, et al. Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. Comparison with plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide. *Circulation* 1996; 93: 1963-9.
133. Darbar D, Davidson NC, Gillespie N, et al. Diagnostic value of B-type natriuretic peptide concentrations in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1996; 78: 284-7.
134. Crilly JG, Farrer M. Left ventricular remodeling and brain natriuretic peptide after first myocardial infarction. *Heart* 2001; 86: 638-42.
135. Richards AM, Doughty R, Nicholls MG, et al. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: prognostic utility and prediction of benefit from carvedilol in chronic ischemic left ventricular dysfunction. Australia-New Zealand Heart Failure Group. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1781-7.
136. de Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001; 345: 1014-21.
137. McDonagh TA, Cunningham AD, Morrison CE, et al. Left ventricular dysfunction, natriuretic peptides, and mortality in an urban population. *Heart* 2001; 86: 21-6.
138. Omland T, Persson A, Ng L, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 106: 2913-8.
139. Jernberg T, Stridsberg M, Lindahl B. Usefulness of plasma N-terminal proatrial natriuretic peptide (proANP) as an early predictor of outcome in unstable angina pectoris or non-ST-elevation acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2002; 89: 64-6.
140. Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, Lindahl B. N-terminal pro brain natriuretic peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 437-45.
141. Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide for risk assessment in unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: B-type natriuretic peptide and prognosis in TACTICS-TIMI 18. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1264-72.
142. Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, et al. B-type natriuretic peptides and ejection fraction for prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 2003; 107: 2786-92.
143. James SK, Lindahl B, Siegbahn A, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients with unstable coronary artery disease: a Global Utilization of Strategies to Open Occluded Arteries (GUSTO)-IV substudy. *Circulation* 2003; 108: 275-81.
144. Galvani M, Ottani F, Oltrona L, et al, for the Italian Working Group on Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology and the Associazione Nazionale Medici Cardiologi Ospedalieri (ANMCO). N-terminal pro-brain natriuretic peptide on admission has prognostic value across the whole spectrum of acute coronary syndromes. *Circulation* 2004; 110: 128-34.
145. Talwar S, Squire IB, Downie PF, et al. Profile of plasma N-terminal proBNP following acute myocardial infarction; correlation with left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J* 2000; 21: 1514-21.
146. de Lemos JA, Morrow DA. Combining natriuretic peptides and necrosis marker in the assessment of acute coronary syndromes. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4 (Suppl 4): S37-S46.
147. Maewal P, de Lemos JA. Natriuretic peptide hormone measurement in acute coronary syndromes. *Heart Fail Rev* 2003; 8: 365-8.
148. Galvani M, Ferrini D, Ottani T. Natriuretic peptides for risk stratification of patients with acute coronary syndromes. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 327-33.
149. Nakao K, Mukoyama M, Hosoda K, et al. Biosynthesis, secretion, and receptor selectivity of human brain natriuretic peptide. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69: 1500-6.
150. Jernberg T, James S, Lindahl B, et al. Natriuretic peptides in unstable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2004; 25: 1486-93.

151. Baxter GF. Natriuretic peptides and myocardial ischaemia. *Basic Res Cardiol* 2004; 99: 90-3.
152. Wu X, Seino Y, Ogura H, Fukuma N, Katoh T, Takano T. Plasma natriuretic peptide levels and daily physical activity in patients with pacemaker implantation. *Jpn Heart J* 2001; 42: 471-82.
153. Kinugawa T, Kato M, Ogino K, et al. Neurohormonal determinants of peak oxygen uptake in patients with chronic heart failure. *Jpn Heart J* 2003; 44: 725-34.
154. Williams SG, Ng LL, O'Brien RJ, Taylor S, Li YF, Tan LB. Comparison of plasma N-brain natriuretic peptide, peak oxygen consumption, and left ventricular ejection fraction for severity of chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2004; 93: 1560-1.
155. Wiviott SD, de Lemos JA, Morrow DA. Pathophysiology, prognostic significance and clinical utility of B-type natriuretic peptide in acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta* 2004; 346: 119-28.
156. Grabowski M, Filipiak KJ, Karpinski G, et al. Serum B-type natriuretic peptide levels on admission predict not only short-term death but also angiographic success of procedure in patients with acute ST-elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty. *Am Heart J* 2004; 148: 655-62.
157. Sadanandan S, Cannon CP, Chekuri K, et al. Association of elevated B-type natriuretic peptide levels with angiographic findings among patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 564-8.
158. Jernberg T, Lindahl B, Siegbahn A, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide in relation to inflammation, myocardial necrosis, and the effect of an invasive strategy in unstable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1909-16.
159. White HD, French JK. Use of brain natriuretic peptide levels for risk assessment in non-ST-elevation acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1917-20.
160. Prontera C, Emdin M, Zucchelli GC, Ripoli A, Passino C, Clerico A. Automated electrochemiluminescent immunoassay for N-terminal pro-BNP compared with IRMAs for ANP and BNP in heart failure patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2003; 49: 1552-4.
161. Prontera C, Emdin M, Zucchelli GC, Ripoli A, Passino C, Clerico A. Analytical performance and diagnostic accuracy of a fully-automated electrochemiluminescent assay of the N-terminal fragment of brain natriuretic peptide in patients with cardiomyopathy: comparison with immunoradiometric assay methods for brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 37-44.
162. Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, Haltmayer M. Head-to-head comparison of the diagnostic utility of BNP and NT-proBNP in symptomatic and asymptomatic structural heart disease. *Clin Chim Acta* 2004; 341: 41-8.
163. Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, Haltmayer M. Biochemical diagnosis of impaired left ventricular ejection fraction - comparison of the diagnostic accuracy of brain natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP). *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 159-63.
164. Hammerer-Lercher A, Ludwig W, Falkensammer G, et al. Natriuretic peptide as markers of mild forms of left ventricular dysfunction: effects of assays on diagnostic performance of markers. *Clin Chem* 2004; 50: 1174-83.
165. Sackett DL, Haynes RB. The architecture of diagnostic research. *BMJ* 2002; 324: 539-41.
166. Kellett J. Prediction of in-hospital mortality by brain natriuretic peptide levels and other independent variables in acutely ill patients with suspected heart disease. *Can J Cardiol* 2004; 20: 686-90.