

Raccomandazioni sull'impiego clinico dei peptidi natriuretici cardiaci

M. Zaninotto*, M. Plebani per il Gruppo di Studio "Biochimica Clinica Cardiovascolare"**

*Servizio Medicina di Laboratorio,

**Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica e Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera - Università degli Studi - Padova

Esperti che hanno fatto parte del Comitato che ha preparato le Raccomandazioni

M. Emdin¹, A. Clerico¹, F. Clemenza², M. Galvani³, R. Latini⁴, S. Masson⁴, P. Mulè⁵, M. Panteghini⁶, R. Valle⁷, M. Zaninotto⁸, A. Ganau⁹, R. Mariotti¹⁰, M. Volpe¹¹, N. Aspromonte¹², G. Cacciatore¹³, P. Cappelletti¹⁴, A. L'Abbate¹, F. Miglio⁵, F. Ottani³, F. Pagani¹⁵, C. Passino¹, M. Plebani⁸, R. Sarzani¹⁶, G.C. Zucchelli¹

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

PREMESSA

La scoperta della funzione endocrina del cuore (che somma alla funzione contrattile quelle di regolazione del tono vasomotore e dell'omeostasi idro-salina, e di controregolazione dei principali sistemi vasocostrittori e sodioritettori) e, di pari passo, lo sviluppo di metodologie di determinazione via via più accurate e di facile e celere applicazione hanno portato a riconoscere la valenza fisiopatologica e clinica (diagnostica e prognostica) dei peptidi natriuretici cardiaci (PNC) nella patologia cardiovascolare, in particolare nelle sindromi coronariche e nello scompenso cardiaco (1).

Nell'intento di sviluppare e diffondere una raccomandazione per l'impiego clinico dei PNC che fosse definita col consenso sia di laboratoristi che di clinici, un comitato di esperti designati dalle società scientifiche coinvolte, ha promosso una conferenza di consenso nazionale sul tema dell'impiego diagnostico dei PNC 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.

L'iniziativa, che si è articolata in varie fasi, ha consentito alla fine di sottoporre nel periodo Aprile- Ottobre 2004 un Documento di Consenso sotto forma di Raccomandazioni all'attenzione delle Società Scientifiche Nazionali di Biochimica Clinica, Medicina di Laboratorio (Società Italiana di Biochimica 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 di Medicina d'Urgenza (Società Italiana di Medicina d'Urgenza -SIMEU), che, dopo approvazione ne hanno consentito la pubblicazione in forma integrale sulla Rivista Italian Heart Journal, sia nella versione in lingua italiana che inglese (2) sia in forma riassuntiva nelle riviste delle singole Società Scientifiche.

Lo scopo di questa pubblicazione su "Biochimica Clinica" è quello di riassumere le parti più rilevanti e di specifico interesse dell'articolo originale per coloro che si interessano di medicina di laboratorio. La stesura originale della Raccomandazione (2) si compone di una introduzione che discute in dettaglio sia gli aspetti metodologici che clinici del dosaggio dei PNC, in particolare quello del BNP e del peptide ad esso correlato NT-proBNP (vedere Appendice I, Nomenclatura ed Abbreviazioni). Le raccomandazioni sono basate su dati della letteratura considerati dagli esperti i più significativi e riflettono dunque le conoscenze attuali in un ambito di diagnostica biochimica soggetto a continua innovazione metodologica e a 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 Cardiology* (ESC) e dall'*American Heart Association* (AHA) / *American College of Cardiology* (ACC) (Tabella 1) (3,4). Per ogni raccomandazione 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.

Aspetti Analitici e Preanalitici della Determinazione di BNP e NT-proBNP

Aspetti analitici

Caratterizzazione dell'antigene misurato

A livello dei miocardiociti i PNC sono prodotti sotto forma di pro-ormoni, con una catena amminoacidica molto più lunga dell'ormone attivo circolante. Per esempio, il BNP è immagazzinato come pro-ormone con una catena di 108 aminoacidi (proBNP₁₋₁₀₈), che al momento del rilascio è tagliata in un frammento inattivo, NH₂-terminale proBNP₁₋₇₆, e in una forma biologicamente attiva, cioè il BNP vero e proprio (segmento COOH-terminale proBNP₇₇₋₁₀₈) (Appendice I). Per cui nel plasma si può dosare l'ormone attivo BNP od il peptide inattivo ad esso correlato, generalmente denominato NT-proBNP. L'ormone attivo BNP presenta un'emivita molto più breve (circa 15-20 minuti) di quella del peptide inattivo NT-proBNP (probabilmente più di 60 minuti), come anche livelli circolanti meno elevati.

Tabella 1
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 dannoso/a.

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.

Tuttavia, relativamente poco si conosce sul tipo di molecole presenti nel sangue in condizioni fisiologiche e fisiopatologiche. E' 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-proBNP (5-7). 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 scompenso cardiaco congestizio (SCC), la cui natura non è ancora stata completamente chiarita. E' stato, ad esempio, dimostrato che la sequenza amminoterminale del proBNP e dei peptidi da esso derivati, come 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 determinazione. C'è infine da rilevare che il BNP viene degradato proteoliticamente *in vivo* e *in vitro* attraverso il distacco dei due amminoacidi amminoterminali serina77-prolina78 per azioni di proteasi plasmatiche (8).

Specificità degli anticorpi

Molti degli aspetti relativi alle diversità metodologiche dipendono dalla diversa specificità degli anticorpi utilizzati nei test. E' 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 (9). Anche per la determinazione del NT-proBNP, il sito di reazione anticorpale è vitale per la specificità dell'immunosaggio; è importante ricordare che per i metodi che dichiarano di misurare NT-proBNP raramente è valutata la crossreattività tra proBNP, NT-proBNP e i suoi prodotti di scissione.

Configurazione e specificità dei metodi commerciali

Appare 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 (aa 90-97) e l'estremo N-terminale del BNP (aa 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) i suoi prodotti metabolici, inclusi BNP e NT-proBNP, con specificità variabile. E' tuttavia chiaro che per l'impiego della determi-

nazione di questi peptidi natriuretici come indicatori ("marker") 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, che utilizzano 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 (10). 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 ed alla diversa standardizzazione analitica derivata dall'impiego di differenti materiali di calibrazione. Infine, la discrepanza riportata tra le concentrazioni ottenute con metodi diversi si riflette direttamente sul valore dei limiti di riferimento e dei livelli decisionali corrispondenti che spesso variano secondo il metodo utilizzato (Tabella 2) (11).

E' del tutto evidente quindi la necessità di una standardizzazione che, attraverso la selezione di appropriati materiali di riferimento e di una 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. 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 (Appendice II).

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 (aa 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.

Tabella 2

Valori di riferimento ed imprecisione analitica relativi ad alcuni metodi commercialmente disponibili per la determinazione di BNP e NT-proBNP (risultati in ng/L)

Metodo	Media±SD ng/L	Mediana a ng/L	Intervallo	97,5° percentile	15% CV
IRMA BNP	10.7±9.9	7.1	0.4-66.1	40	20
MEIA BNP	22.2±29.7	13.4	<5-220.7	105	100
ADVIA BNP	13.5±11.9	9.4	<3-65.9	45	20
POCT BNP	10.4±7.2	7.6	<8-62.5	40	15
ECLIA NT-proBNP	49.4±35.4	40.9	6.7-219.8	155	<15

IRMA BNP: metodo immunoradiometrico (IRMA) manuale (Shionogi).

MEIA BNP: metodo "Microparticles-Enzyme-Immuno-Assay" (MEIA) per analizzatore AxSYM (Abbott Diagnostici).

ADVIA BNP: metodo per analizzatore Centaur (Bayer Diagnostici).

POCT BNP: metodo "Point-Of-Care Testing" (POCT) TRIAGE (Biosite Diagnostici).

ECLIA NT-proBNP: metodo in elettrochemiluminescenza (ECLIA) per analizzatore Elecsys (Roche Diagnostici).

Raccomandazione 2: E' 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: E' 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 ed 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 clinica ed ECG.
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 amminoacidi (aa).
- *Propeptide natriuretico di tipo B (proBNP):* ha origine per il distacco di un peptide segnale di 26 aa dal pre-proBNP, configurandosi in proBNP (aa 1-108). E' 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 (aa 77-108). Presente sia nel miocardio sia nel plasma.
- *Frammento amminotermiale del propeptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP):* corrispondente al frammento amminotermiale (aa 1-76) del proBNP, sembra non pos-

sedere attività ormonale. E' 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 [es. NT-proBNP (aa 1-21)], dei quali però poco si conosce sia in termini metabolici che fisiopatologici.

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 di BNP e NT-proBNP disponibili mostrano differenti specificità immunologiche e valori di riferimento (Tabella 2) (12-15);

b) i cut-off ottimali, spesso ottenuti dalle analisi delle curve ROC (valore corrispondente al valore massimo della somma di specificità + sensibilità), non solo dipendono dal tipo di peptidi misurati (ANP, NT-proANP, BNP o NT-proBNP) e dai rispettivi metodi di dosaggio utilizzati, ma anche:

1. dal "gold standard" utilizzato per classificare le risposte (positive/negative, vere/false) dell'esame di laboratorio;
2. dalla condizione clinica in cui si testa l'accuratezza diagnostica;
3. dalla prevalenza di malattia nel contesto studiato;
4. dalla gravità e severità della patologia nei pazienti considerati;
5. dal tipo di interpretazione dell'analisi statistica utilizzata.

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 (*evidence-based*) 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 maggiori del 95% (16).

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 (ditta Shionogi), utilizzato fin dall'inizio degli anni 90 per la diagnosi di insufficienza cardiaca e la metodica POCT Triage (ditta Biosite Diagnostics), la cui utilità è basata soprattutto sugli studi *Breathing Not Properly Multinational Study Investigators and BNP Multinational Study Investigators*, che hanno valutato più volte lo stesso gruppo di pazienti, suddividendolo di volta in volta in differenti sottogruppi (17-19). Non vi sono attualmente osservazioni sufficienti per i metodi di dosaggio del BNP resi disponibili nel commercio 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 2, un valore inferiore a 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. E' importante notare come lo studio *Breathing Not Properly Multinational Study Investigators* presentasse una sensibilità media del 97% ed un valore predittivo negativo del 96% per un valore corrispondente a 50 ng/L (18).

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 della ditta Roche. E' infatti disponibile da troppo poco tempo il metodo per il sistema Dimension, distribuito dalla ditta 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 metodiche manuali per il dosaggio dei peptidi correlati alla porzione NT-proBNP non facilmente applicabili alla routine clinica (20,21).

Analogamente a quanto riportato per il dosaggio del BNP, potrebbe essere utilizzato come livello decisionale per l'NT-proBNP, un valore vicino al 97,5° percentile della distribuzione dei valori nei soggetti sani, per escludere la diagnosi di scompenso cardiaco. Tale valore, utilizzando sia i dati presenti in letteratura, che quelli riportati nella Tabella 2, potrebbe essere indicato in 150 ng/L.

Valore prognostico nei pazienti con SCA

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 PNC (22).

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.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Emdin M, Clerico A, Clemenza F, Galvani M, Latini R, Masson S, et al. Recommendations for the clinical use of cardiac natriuretic peptides. *Ital Heart J Suppl.* 2005 May; 6: 308-25.
3. ACC/AHA Task Force on practice guidelines (Committee on the management of patients with unstable angina). ACC/AHA guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction- 2002. *Circulation* 2002; 106: 1893-1900.
4. 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).
5. 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.
6. Goetze JP. Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: the endocrine heart revisited. *Clin Chem* 2004; 50:1503-10.
7. 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.
8. Shimizu H, Masuta K, Aono K et al. Molecular forms of brain natriuretic peptide in plasma. *Clin Chim Acta* 2002; 316:129-35
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. Collinson PO, Barnes SG, 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.
15. 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
16. Sackett DL, Haynes RB. The architecture of diagnostic research. *BMJ* 2002; 324:539-41
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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; 15; 20: 686-90.