

Stato dell'arte dell'immunodosaggio dei peptidi natriuretici di tipo B

Concetta Prontera¹, Maria Franzini², Silvia Masotti³, Stefania Giovannini⁴, Gian Carlo Zucchelli⁴, Aldo Clerico^{1,3} a nome del Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio Biomarcatori di Rischio Cardiovascolare

¹Fondazione Toscana G. Monasterio, Pisa

²Dipartimento di Ricerca Traslationale, Università di Pisa

³Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

⁴Istituto di Fisiologia Clinica del CNR e QualiMedLab srl, Pisa

ABSTRACT

State of the art of B-type natriuretic peptide (BNP) immunoassays. Recent studies have demonstrated that the precursor of BNP (proBNP) constitutes the major part of BNP-related peptides detectable in plasma of patients with heart failure by the commercially available immunoassays considered specific for the BNP hormone. Since proBNP significantly cross-reacts with commercial immunoassays for BNP, manufacturers should test and clearly declare the cross-reaction with proBNP in their BNP methods. Owing to the differences in cross-reaction with proBNP as well as in specificity, respectively, for the NH₂- or COOH-terminal part of the peptide hormone chain, BNP immunoassays show significant between-method differences. Immunoassays for NT-proBNP, which all use standard materials and antibodies provided by the same company, show lower differences (generally <20%). Clinicians should take into account these differences among methods when they compare results obtained from different laboratories, which use different BNP immunoassays. Accordingly, the use of a common decisional limit for all BNP immunoassay methods, as suggested by the most recent international guidelines, may be unreliable.

INTRODUZIONE

I peptidi natriuretici cardiaci costituiscono una complessa famiglia di ormoni peptidici prodotti e secreti dal cuore (1-3). In particolare, l'ormone natriuretico peptidico di tipo B (BNP) è prodotto mediante il taglio enzimatico di un propeptide più grande (proBNP) che dà origine a una porzione COOH-terminale, che è l'ormone BNP, e a un peptide inattivo NH₂-terminale (NT-proBNP).

Dal punto di vista clinico, molti studi, incluse alcune meta-analisi, hanno confermato che BNP e NT-proBNP mostrano un elevato grado di accuratezza diagnostica e prognostica in pazienti con insufficienza cardiaca e possono anche essere utili nel "follow-up" di questi pazienti (4-11). In accordo con queste evidenze, tutte le linee guida, sia nazionali (12) che internazionali (13-17), raccomandano con il maggior grado di evidenza l'utilizzo del dosaggio di BNP e NT-proBNP per la diagnosi e la stratificazione del rischio dei pazienti, sia ospedalizzati che ambulatoriali, con scompenso cardiaco acuto o cronico. Rimangono alcuni dubbi sull'efficienza e sul positivo rapporto costo/beneficio del loro utilizzo nel guidare la terapia di questi pazienti (2, 18). Infatti, le più

recenti linee guida internazionali suggeriscono l'utilizzo del dosaggio dei peptidi natriuretici per guidare la terapia solo con un livello di evidenza intermedio (classe IIb), in quanto sarebbero necessari altri studi randomizzati per dimostrare definitivamente l'efficacia del dosaggio di BNP/NT-proBNP nel trattamento dello scompenso cardiaco (18).

D'altra parte, la specificità analitica dei metodi, soprattutto di quelli considerati specifici per l'ormone BNP, deve essere meglio accertata. Molti studi hanno ormai dimostrato che la maggior parte dei peptidi natriuretici circolanti di tipo B, soprattutto in pazienti con scompenso cardiaco di grado severo, è strutturalmente simile al precursore dell'ormone proBNP e sembrano possedere un'attività ridotta o assente (2, 19-24). Questi peptidi correlati al proBNP sembrano cross-reagire in maniera significativa con tutti i metodi comunemente utilizzati per la misura di BNP e NT-proBNP (24). Alla luce di questi risultati, le specifiche di qualità (25, 26) e le raccomandazioni (12-17) sul dosaggio dovrebbero essere aggiornate, soprattutto per quanto riguarda la misura dell'ormone BNP (27-30).

Scopo di questo articolo è quello di discutere lo stato

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Fondazione Regione Toscana G. Monasterio, Via Trieste 41, 56126 Pisa. Tel. 0585493601, Fax 0585493569, E-mail clerico@ifc.cnr.it

Ricevuto: 16.03.2015

Revisionato: 19.05.2015

Accettato: 03.06.2015

dell'arte dei metodi di dosaggio immunometrici della famiglia dei peptidi natriuretici di tipo B. In particolare, saranno prima riassunti i risultati dei più recenti studi che riguardano produzione, secrezione e metabolismo periferico dei peptidi natriuretici di tipo B e le conseguenze di questi nuovi dati sulla specificità della misura dell'ormone BNP e dei peptidi a esso correlati. Successivamente, saranno discusse le caratteristiche analitiche e le specifiche di qualità dei metodi di dosaggio dei peptidi proBNP, NT-proBNP e BNP. Infine, saranno discusse interpretazione e rilevanza clinica dei risultati.

PRODUZIONE, SECREZIONE E METABOLISMO DEI PEPTIDI NATRIURETICI DI TIPO B

Nell'uomo il BNP è sintetizzato a partire da un peptide precursore di 134 amminoacidi denominato pre-proBNP (1, 2, 31). Dal ribosoma, il pre-propeptide trasloca nel reticolo endoplasmico dove, dopo la perdita del peptide segnale idrofobico NH₂-terminale, costituito da 26 amminoacidi, subisce un'altra importante trasformazione post-traduzionale con la formazione del ponte disulfuro tra i due residui di cisteina in posizione 86 e 102 e diventa il propeptide proBNP₁₋₁₀₈ (proBNP). La formazione del ponte tra i residui di cisteina è importante dal punto di vista fisiologico, in quanto questa struttura ad anello è responsabile del legame con i recettori specifici e quindi dalla sua presenza dipende l'attività biologica dell'ormone. Sempre a livello del reticolo endoplasmico o nei granuli di secrezione, delle convertasi, come corina e furina, possono tagliare la catena peptidica a livello del peptide in posizione 73-76 (arginina-alanina-prolina-

arginina) (2, 31), producendo un peptide NH₂-terminale di 76 amminoacidi, NT-proBNP, e un peptide più corto di 32 amminoacidi COOH-terminale, l'ormone peptidico biologicamente attivo BNP (Figura 1). Nell'apparato di Golgi il proBNP può subire altre trasformazioni post-traduzionali, come la glicosilazione (32-37). La glicosilazione in posizione 71 (treonina 71), che è vicina al sito di clivaggio in posizione 76, può bloccare o guidare il processo di taglio enzimatico (31, 36, 37). In accordo con i risultati di alcuni studi (32-37), il proBNP prodotto nei cardiomiociti può avere destini differenti: a) il proBNP può non essere glicosilato e quindi tagliato enzimaticamente in modo da formare i peptidi BNP e NT-proBNP, b) alcune molecole di proBNP possono essere glicosilate e in particolare quelle glicosilate in posizione 71 sono secrete come peptide intatto (cioè il proBNP non viene tagliato enzimaticamente in posizione 76), c) le convertasi non sono in grado di tagliare tutte le molecole di proBNP, anche quelle non glicosilate, soprattutto quando la produzione del pro-ormone è molto aumentata, come accade nei pazienti con grave scompenso cardiaco, per cui in circolo si può trovare proBNP intatto sia glicosilato che non glicosilato (2, 31). Infatti, in circolo si possono evidenziare mediante cromatografia e misurare con metodi immunometrici o con spettrometria di massa i tre principali peptidi (il precursore intatto proBNP, il peptide inattivo NT-proBNP e l'ormone BNP) più alcuni peptidi da loro derivati per azione della degradazione da parte degli enzimi plasmatici (2, 31). proBNP e NT-proBNP, come anche alcuni peptidi da loro derivati, possono essere presenti sia in forma glicosilata che non glicosilata, mentre il BNP non è glicosilato. Le

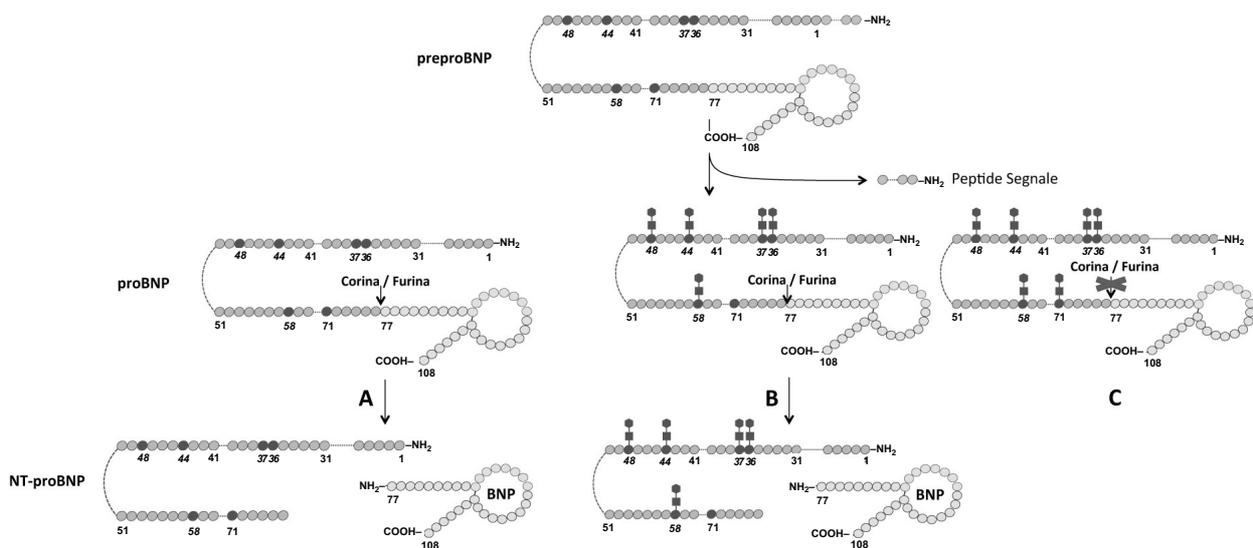


Figura 1

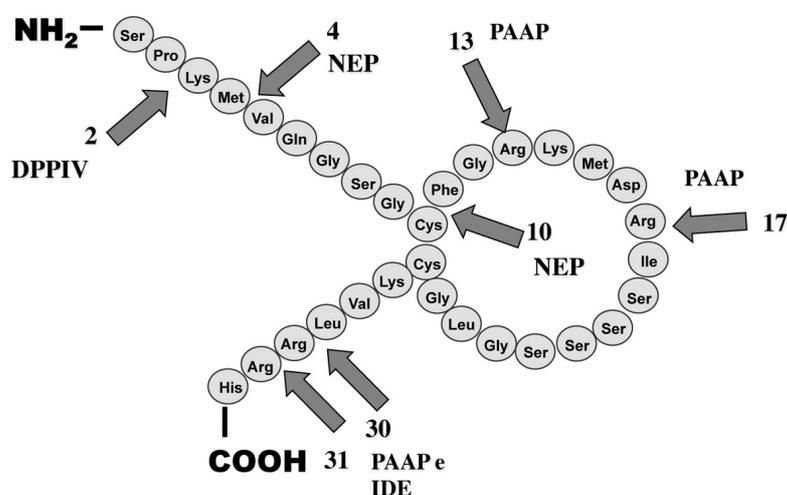
Principali vie di produzione e secrezione dei peptidi natriuretici di tipo B nell'uomo. L'ormone BNP è sintetizzato a partire da un peptide precursore di 134 amminoacidi, denominato pre-proBNP, che si trasforma nel citoplasma in un pro-ormone di 108 amminoacidi (proBNP). Il proBNP viene poi scisso producendo un peptide NH₂-terminale di 76 amminoacidi, NT-proBNP, e un peptide più corto di 32 amminoacidi COOH-terminale, BNP. Il proBNP può subire altre trasformazioni post-traduzionali come la glicosilazione.

Tabella 1

Principali caratteristiche dei peptidi BNP, NT-proBNP e proBNP

	BNP	NT-proBNP	proBNP
PM	3462 Da	8457 Da ^a	11.900 Da ^a
Numero amminoacidi	32	76	108
Funzione biologica	Ormone attivo	Inattivo	Pro-ormone
Emivita	15-20 min	>60 min	>60 min
Glicosilazione	Non glicosilato	Glicosilato	Glicosilato

^aIl PM dei peptidi NT-proBNP e proBNP dipende dal loro grado di glicosilazione; nella tabella sono riportati i valori relativi ai peptidi non glicosilati.

**Figura 2**

Vie di degradazione del BNP con i possibili siti lungo la catena peptidica su cui agiscono i differenti enzimi con attività peptidasi. DPPiV, dipeptidil peptidasi IV; NEP, neprilislina; PAAP, "peptidyl arginine aldehyde protease"; IDE, "insulin degrading enzyme".

principali caratteristiche biochimiche e fisiologiche dei peptidi proBNP, NT-proBNP e BNP sono riassunte nella Tabella 1.

Nel plasma il BNP è rapidamente degradato da diverse peptidasi, come la dipeptidil peptidasi IV (DPPiV) (38-40) e l'endopeptidasi neutra [detta anche neprilislina (NEP)] (41-44), mentre non è ancora chiaro se altri enzimi plasmatici, come la meprina A, contribuiscano al catabolismo dell'ormone (43, 45). Inoltre, alcuni studi hanno suggerito che l'enzima che degrada l'insulina ("insulin degrading enzyme", IDE) possa anche degradare il BNP in peptidi più corti (46-48). Infine, alcuni autori (49) hanno suggerito che altre proteasi, come l'enzima PAAP ("peptidyl arginine aldehyde protease"), potrebbero essere in grado di degradare il BNP a livello dei siti specifici della catena in cui sono presenti residui dell'arginina (Figura 2).

Un grande numero di frammenti peptidici derivati dal proBNP sono stati identificati nel plasma per mezzo di tecniche cromatografiche e di spettrometria di massa, sia utilizzando modelli animali che campioni di pazienti con scompenso cardiaco (19, 20, 22, 31, 50-55). Come abbiamo già osservato, sia proBNP che NT-proBNP, come probabilmente altri peptidi più corti da essi

derivati, sono presenti specialmente nel plasma di pazienti con scompenso cardiaco sia in forma non glicosilata che glicosilata (23, 33, 35, 52, 53). È importante sottolineare che studi recenti suggeriscono che il proBNP potrebbe rappresentare una parte consistente dell'immunoreattività misurata nel plasma con i metodi comunemente utilizzati per il BNP e addirittura la maggior parte di questa nei pazienti con scompenso cardiaco severo in classe funzionale NYHA ("New York Heart Association") IV (22, 24, 33, 37, 50, 51). Inoltre, alcuni studi hanno suggerito che l'ormone attivo BNP possa essere prodotto anche in circolo dal precursore proBNP per mezzo dell'azione catalitica di alcune proteasi plasmatiche, come la corina (55-57). Tale fenomeno è stato effettivamente documentato *in vivo* in un modello animale (58). Questi studi hanno di fatto completamente cambiato la visione del sistema ormonale dei peptidi natriuretici di tipo B. Da un punto di vista fisiologico, il precursore proBNP dovrebbe essere considerato un pro-ormone circolante. Se ciò è vero, dobbiamo assumere che esistono due pool distinti di proBNP da cui può essere prodotto l'ormone attivo BNP; da una parte, il pool citoplasmatico dei miocardiociti e dall'altra il pool plasmatico del proBNP

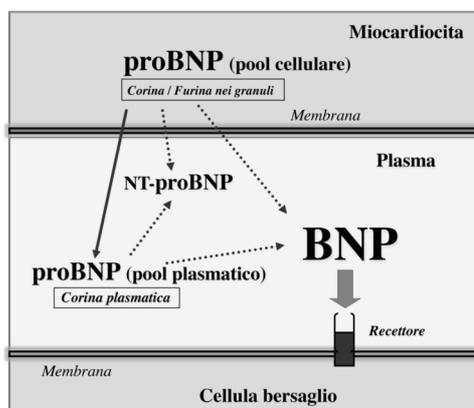


Figura 3

Pool citoplasmatico cellulare e plasmatico del proBNP. Esistono due pool distinti di proBNP da cui può essere prodotto l'ormone BNP: il pool citoplasmatico dei miocardiociti e quello plasmatico del proBNP, che risiede per un certo tempo (alcune ore) in circolo.

secreto dai miocardiociti che risiede per un certo tempo (si pensa almeno alcune ore) in circolo (Figura 3) (3, 28). Inoltre, si potrebbe ipotizzare che la trasformazione enzimatica che avviene in circolo del proBNP a BNP sia sottoposta a regolazione e che questo meccanismo di regolazione sia alterato nei pazienti con scompenso cardiaco (28, 59). Questa ipotesi, se confermata, potrebbe aprire nuove prospettive terapeutiche indicando un nuovo bersaglio farmacologico utile per contrastare la resistenza all'azione dei peptidi natriuretici, che rappresenta uno dei meccanismi fisiopatologici più importanti dello scompenso cardiaco (2, 59-62).

CONSIDERAZIONI SUI METODI DI DOSAGGIO DEI PEPTIDI NATRIURETICI DI TIPO B

Fin dagli anni '90, pochi anni dopo la scoperta di questa famiglia di ormoni (63-65), sono stati messi a punto dei metodi immunologici competitivi di tipo RIA o EIA per il dosaggio del BNP. Tali metodi erano caratterizzati da una scarsa sensibilità e specificità, per cui era necessaria una fase preliminare cromatografica per migliorarne le prestazioni analitiche (66-68). Alla fine degli anni '90 e nei primi anni del nuovo secolo sono comparsi i primi metodi immunometrici non competitivi di tipo "sandwich" per BNP e anche per NT-proBNP, che utilizzavano due fasi leganti specifiche (i primi metodi utilizzavano anticorpi policlonali, quelli più recenti anticorpi monoclonali) allo scopo di incrementare sia la sensibilità che la specificità analitica (68, 69). Le specifiche di qualità della misura sono state riportate da alcuni gruppi di esperti nel corso degli ultimi 10 anni (12, 17, 25, 26). Più recentemente sono comparsi metodi per la misura del proBNP (3, 28, 54).

Metodi di dosaggio di BNP e NT-proBNP

Una storia dettagliata dei metodi di dosaggio dell'ormone BNP e del peptide NT-proBNP è stata riportata in precedenti rassegne sull'argomento (66-69). Discuteremo in questo paragrafo le più recenti innovazioni metodologiche e i risultati degli studi che riguardano la valutazione e il confronto delle prestazioni analitiche.

La prima e più importante considerazione da fare è che questi metodi subiscono in varia misura interferenze dovute alla presenza nel campione del peptide proBNP (dal 17% al 38% i metodi del BNP e dal 29% al 259% i metodi del peptide NT-proBNP, rispettivamente) (24). Considerando che il peptide proBNP può rappresentare nel plasma dei pazienti con scompenso cardiaco severo il peptide con la più elevata concentrazione (19, 20, 22, 31, 50-55), questa cross-reazione comporta alcune importanti ricadute sull'interpretazione fisiopatologica e clinica dei risultati dei più comuni metodi di dosaggio mediante piattaforme automatizzate (3, 28, 70).

I metodi immunometrici automatizzati per la determinazione del NT-proBNP utilizzano tutti anticorpi e standard prodotti da un'unica ditta (Roche Diagnostics), mentre quelli per il BNP utilizzano anticorpi e standard di ditte differenti (25, 26, 71, 72). Di fatto, utilizzando i risultati di un programma di VEQ, si possono evidenziare solo "bias" <20% tra i metodi immunometrici per il peptide NT-proBNP (27, 29). Al contrario, si possono riscontrare ampie variazioni (fino al doppio) tra i risultati dei metodi immunometrici per il BNP, sia utilizzando per il confronto campioni di soggetti sani che cardiopatici, sia materiali di controllo distribuiti in un programma di VEQ (27-30). Evidentemente, le ampie differenze tra i risultati prodotti dai metodi immunometrici per il BNP sono dovute da una parte alla grande quantità di peptidi con struttura correlata al BNP presenti nei campioni di plasma e dall'altra alle differenti caratteristiche degli standard e degli anticorpi utilizzati (27-30, 73-76). Le più importanti caratteristiche riguardanti gli anticorpi e gli standard utilizzati dai più comuni metodi immunometrici disponibili in Italia sono riportate nella Tabella 2. Nella Figura 4 sono evidenziati gli epitopi dell'ormone considerati specifici per gli anticorpi utilizzati dai più comuni metodi di dosaggio del BNP. Nella Figura 5 sono riportati i risultati della VEQ CardioOrmoCheck, riguardanti i cicli 2013 e 2014.

I metodi più comuni per il dosaggio del BNP sono metodi immunometrici non competitivi tipo "sandwich", che utilizzano piattaforme automatizzate. Questi sistemi utilizzano una coppia di anticorpi policlonali o monoclonali, specifici per due epitopi separati della catena peptidica del BNP: uno è utilizzato come fase di cattura, mentre l'altro come portatore del segnale (anticorpo marcato con sostanze fluorescenti o chemiluminescenti). In generale, uno di questi anticorpi è specifico per l'anello cisteinico, in quanto questa scelta assicura una buona corrispondenza tra l'attività biologica, legata alla presenza dell'anello, che si lega ai recettori specifici, e quella immunologica. Il secondo

Tabella 2

Caratteristiche degli anticorpi e degli standard utilizzati dai più comuni metodi di dosaggio di BNP e NT-proBNP

Metodo	Anticorpo di cattura	Anticorpo di rilevazione	Standard
BNP			
CMIA Architect (Abbott Diagnostics)	NH ₂ -terminale (in parte comprende anche l'anello cisteinico), anticorpo monoclonale, epitopo amminoacidi 5-13 (Scios)	COOH-terminale, anticorpo monoclonale murino, epitopo amminoacidi 26-32	BNP sintetico
Triage BNP (Alere Italia)	NH ₂ -terminale (in parte comprende anche l'anello cisteinico), anticorpo monoclonale, epitopo amminoacidi 5-13 (Scios)	BNP, anticorpo murino policlonale, epitopo non caratterizzato (probabilmente N-terminale 1-10) (Biosite)	BNP ricombinante
Triage per piattaforme Access e Dxl (Beckman Coulter)	BNP, anticorpo murino policlonale, epitopo non caratterizzato (probabilmente N-terminale 1-10) (Biosite)	NH ₂ -terminale (in parte comprende anche l'anello cisteinico), anticorpo monoclonale, epitopo amminoacidi 5-13 (Scios)	BNP ricombinante
Advia Centaur (Siemens Health Care Diagnostics)	COOH-terminale (BC-203), anticorpo monoclonale murino, epitopo amminoacidi 27-32	Anello cisteinico (KY-hBNP11), anticorpo monoclonale murino BNP sintetico (Shionogi)	BNP sintetico
IRMA Shionogi	COOH-terminale (BC-203), anticorpo monoclonale murino, epitopo amminoacidi 27-32	Anello cisteinico (KY-hBNP11), anticorpo monoclonale murino BNP sintetico (Shionogi)	BNP sintetico
AIA-Pack (Tosoh Bioscience)	COOH-terminale (BC-203), anticorpo monoclonale murino, epitopo amminoacidi 27-32	Anello cisteinico (KY-hBNP11), anticorpo monoclonale murino BNP sintetico (Shionogi)	BNP sintetico
NT-proBNP			
ECLIA Elecsys, Modular e Cobas (Roche Diagnostics)	Monoclonale murino, epitopo amminoacidi 27-31	Monoclonale di pecora, epitopo amminoacidi 42-46	NT-proBNP ₁₋₇₆ sintetico
Dimension RxL, Stratus CS, Dimension Vista, Dimension EXL e LM (Siemens Health Care Diagnostics)	NH ₂ -terminale, anticorpo monoclonale di pecora, epitopo amminoacidi 22-28	Parte centrale del peptide, anticorpo monoclonale di pecora, amminoacidi 42-46	NT-proBNP ₁₋₇₆ sintetico
Immunité (Siemens Health Care Diagnostics)	NH ₂ -terminale, anticorpo policlonale di pecora, epitopo amminoacidi 1-21	Parte centrale del peptide, anticorpo policlonale di pecora, epitopo amminoacidi 39-50	NT-proBNP ₁₋₇₆ sintetico

CMIA, "chemiluminescent microparticle immunoassay"; IRMA, "immunospectrometric assay"; ECLIA, "electrochemiluminescence immunoassay".

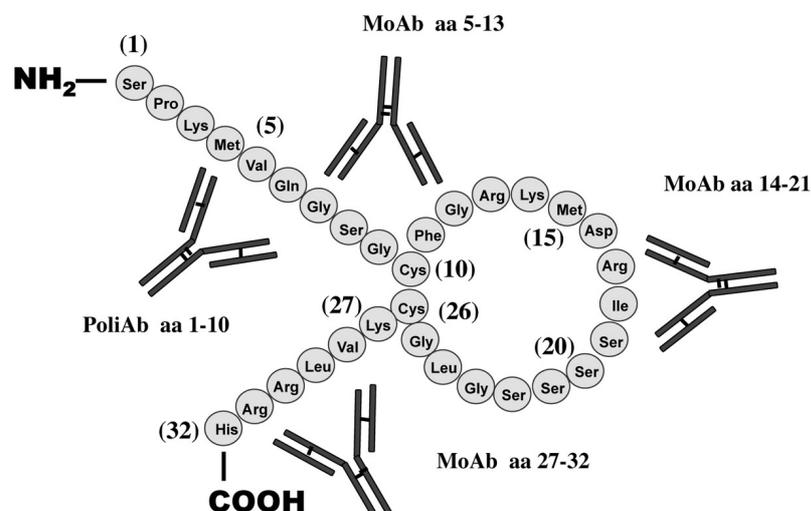


Figura 4

Epitopi anticorpali dei metodi per la misura del BNP.

MoAb, anticorpo monoclonale; aa, amminoacidi; PoliAb, anticorpo policlonale.

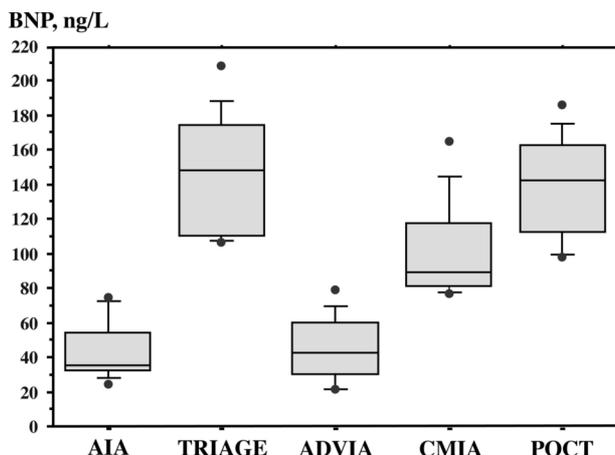


Figura 5

Confronto tra i valori misurati dai metodi di misura del BNP in 12 campioni distribuiti nei cicli 2013 e 2014 della VEQ CardioOrmoCheck. La distribuzione dei valori misurati è raffigurata come box in cui le linee orizzontali indicano rispettivamente 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentile. I valori al di sopra del 90° o al di sotto del 10° percentile sono riportati come valori singoli. È presente una differenza significativa ($P < 0,0001$) tra i metodi AIA e ADVIA e gli altri tre metodi.

AIA, metodo AIA-Pack (Tosoh Bioscience); TRIAGE, metodo Triage Biosite per le piattaforme Dxl e Access (Beckman Coulter); ADVIA, metodo Advia Centaur (Siemens Healthcare Diagnostics); CMIA, metodo CMIA Architect (Abbott); POCT, metodo "point-of-care" sistema Triage Biosite (Alere Italia).

anticorpo è invece specifico per la porzione dell'ormone NH_2 -terminale o COOH -terminale.

L'utilizzo di differenti fasi leganti suggerisce che i metodi del BNP si possono dividere in due gruppi. Il primo comprende i metodi specifici per la porzione NH_2 -terminale, che non sono in grado di misurare i prodotti di degradazione del BNP, che hanno perso gli amminoacidi NH_2 -terminali (come i peptidi BNP_{3-32} e BNP_{10-32}). Il secondo gruppo comprende quelli specifici per la porzione COOH -terminale, che non sono in grado di misurare i peptidi senza la parte COOH -terminale (come il peptide BNP_{1-27}) (28). Risultati che supportano questa ipotesi sono stati riportati in uno studio (49), che ha utilizzato due metodi specifici per la parte COOH -terminale, il metodo immunoradiometrico (Shionogi) e il metodo Advia Centaur (Siemens Healthcare Diagnostics), e un altro specifico per la parte NH_2 -terminale, il metodo Triage Access (Beckman Coulter). Anche i risultati dello studio CardioOrmoCheck (27-30), che ha utilizzato sia campioni di soggetti sani e di pazienti con scompenso cardiaco, che materiali di controllo distribuiti in un programma di VEQ, hanno dimostrato che il metodo immunoradiometrico Shionogi (non più commercializzato in Italia), il metodo Advia Centaur e il metodo AIA-Pack Tosoh Bioscience misurano valori di BNP che sono significativamente più bassi (fino alla metà) di quelli riportati dal metodo POCT ("point-of-care testing") Triage (Alere), dal metodo automatizzato Triage per le piattaforme Dxl e Access (Beckman Coulter) e anche dai metodi MEIA ("microparticle enzyme immunoassay") per la piattaforma AxSYM (non più commercializzato) e CMIA ("chemiluminescent microparticle immunoassay") per la piattaforma Architect (Abbott). È importante rilevare che

i metodi Advia e AIA usano gli stessi anticorpi e materiali di calibrazione forniti dalla ditta Shionogi, mentre i metodi Triage per le piattaforme Dxl e Access e il metodo POCT usano anticorpi e materiali di calibrazione della ditta Alere (Tabella 2). Un confronto tra i dati illustrati nelle Figure 4 e 5 e quelli riportati nella Tabella 2 suggerisce che metodi che utilizzano le stesse fasi anticorpali e i medesimi standard/calibratori mostrano anche i risultati più simili.

Prendendo in considerazione le specifiche di qualità, le ditte produttrici dovrebbero testare e dichiarare il grado di interferenza da parte del proBNP, sia glicosilato che non glicosilato, in quanto il proBNP cross-reagisce significativamente con tutti i più comuni metodi di dosaggio del BNP in maniera più o meno rilevante. Le ditte dovrebbero anche caratterizzare e dichiarare gli epitopi bersaglio delle fasi leganti utilizzati nei loro metodi immunometrici.

Recentemente è stato sviluppato un nuovo metodo POCT che utilizza campioni di sangue capillare per il dosaggio del BNP (77). Il sistema si avvale di cartucce monouso e di uno strumento portatile. Lo strumento fornisce i risultati entro 15 min dall'introduzione della cartuccia con il campione di sangue capillare. In uno studio, valori di BNP misurati con questa metodica sono stati confrontati con quelli ottenuti con il metodo Alere Triage utilizzando la piattaforma UniCell Dxl 800 (Beckman Coulter) (77). I risultati suggeriscono che è possibile misurare il BNP in campioni di sangue capillare con una buona riproducibilità, ottenendo valori ben correlati con i rispettivi livelli circolanti dell'ormone misurati con un sistema automatizzato (77). Per la sua praticità e minore invasività, il nuovo metodo POCT per il dosaggio del BNP su sangue capillare potrebbe

diventare la metodica da preferire nei neonati e nei pazienti disabili.

Metodi di dosaggio del proBNP

Il proBNP è isolato da campioni di plasma o estratti tissutali, mediante procedure cromatografiche e poi misurato con metodi immunologici (67, 68) o, più accuratamente, con la spettrometria di massa (19-23). Questi metodi mostrano certamente un'ottima specificità per il proBNP, ma risultano complessi, costosi, con un prolungato tempo di dosaggio (alcune ore) e non sono quindi consigliabili per un laboratorio clinico, soprattutto in urgenza (3, 67, 68). Per risolvere questi problemi, sono stati sviluppati almeno tre differenti approcci metodologici per la messa a punto di metodi immunometrici diretti (54, 78, 79).

Goetze et al. (78) hanno messo a punto un metodo RIA basato sulla misurazione del plasma trattato con tripsina. Questo enzima proteolitico riduce il peptide proBNP a un frammento che contiene solo i primi 21 amminoacidi della catena peptidica. Il rationale di questo approccio è quello di eliminare le possibili interferenze non specifiche delle proteine plasmatiche. Questo metodo impiega un anticorpo specifico diretto contro i primi 10 amminoacidi del peptide proBNP, come fase legante, e lo stesso peptide, radio-iodinato con clorammina-T, come tracciante. Gli autori hanno misurato con questo metodo la concentrazione totale di proBNP e dei suoi prodotti in volontari sani e in pazienti con scompenso cardiaco, dimostrando valori di proBNP molto più elevati nei pazienti rispetto ai controlli apparentemente sani. Comunque, questo metodo non può essere consigliato per l'applicazione clinica perché richiede un trattamento preliminare dei campioni di plasma con tripsina, un'incubazione molto lunga (fino a 5 giorni) e l'impiego di materiale radioattivo. Inoltre, si può teoricamente assumere che questo metodo misuri tutti i peptidi che contengono la parte N-terminale del precursore proBNP₁₋₁₀₈ e quindi, per esempio, anche il peptide NT-proBNP. Come conseguenza, se si vuole ottenere un'accurata misura dei livelli circolanti del proBNP intatto è anche necessario il dosaggio indipendente e accurato della concentrazione del peptide NT-proBNP. Tuttavia, questo tipo di approccio metodologico per la misura del proBNP potrebbe avere una certa rilevanza da un punto di vista fisiopatologico perché questo metodo permetterebbe una stima di tutta la produzione della famiglia dei peptidi di tipo B da parte dei cardiomiociti, inclusi sia il propeptide intatto circolante che la parte di precursore trasformata dalle convertasi prima della secrezione (o successivamente nel plasma) in NT-proBNP (e BNP).

Tam et al. (79) hanno sviluppato un immunodosaggio tipo "sandwich" con tracciante fluorescente, che riconosce con la stessa efficienza sia il BNP che le forme di proBNP, sia glicosilate che non glicosilate. Questo metodo utilizza un primo anticorpo di cattura specifico per la regione dell'ormone BNP corrispondente ai residui amminoacidici da 11 a 22, che è la parte più stabile del

peptide, comprendente l'anello cisteinico biologicamente attivo. Il secondo anticorpo è utilizzato come anticorpo di rilevazione e riconosce il complesso che si forma quando l'antigene (BNP₁₁₋₂₂) si lega al primo anticorpo. È importante notare che questo metodo non è specifico per il peptide proBNP₁₋₁₀₈ intatto, in quanto può riconoscere tutti i peptidi (più corti del proBNP₁₋₁₀₈) che contengono i residui amminoacidici 11-22 del BNP. Il rationale per l'utilizzo di questo metodo potrebbe essere quello di misurare tutti i peptidi che contengono l'anello cisteinico e che potenzialmente si possono legare ai recettori specifici dei peptidi natriuretici.

Giuliani et al. (54) hanno selezionato un anticorpo monoclonale specifico (chiamato "mAb Hinge76") che riconosce come epitopo specificatamente gli amminoacidi intorno al sito di taglio enzimatico del proBNP, cioè la posizione 76, un epitopo quindi che dovrebbe essere specifico per il precursore intatto (Figura 1). Questo anticorpo riconosce il proBNP ricombinante in modo dose-dipendente, senza mostrare alcuna significativa reattività crociata con altri peptidi correlati, come ad esempio NT-proBNP o BNP. Questi autori hanno quindi sviluppato un metodo immunometrico tipo "sandwich" per misurare il proBNP, combinando l'anticorpo monoclonale mAb Hinge76 con un anticorpo policlonale diretto contro il BNP (54). Successivamente, è stata messa a punto anche una versione automatizzata per la piattaforma BioPlex 2200 (Bio-Rad Laboratories) e ne sono state valutate le caratteristiche analitiche (80). Alcuni studi hanno valutato la rilevanza clinica di questo metodo per la misura del proBNP nella popolazione generale (81), in pazienti con scompenso cardiaco (82, 83), malattia coronarica stabile (84) e insufficienza renale cronica (85).

INTERPRETAZIONE E RILEVANZA CLINICA DEI RISULTATI

Scompenso cardiaco

Il dosaggio degli ormoni natriuretici cardiaci, specialmente dei peptidi natriuretici di tipo B, è raccomandato con il massimo grado di evidenza da tutte le linee guida nazionali e internazionali sia per la diagnosi che per la stratificazione prognostica dei pazienti con scompenso cardiaco (12-17). Sebbene l'utilizzo clinico del dosaggio dei peptidi natriuretici di tipo B sia ormai codificato, alcune considerazioni fisiopatologiche sono tuttavia necessarie per una corretta interpretazione dei risultati che si ottengono con i metodi immunometrici nei pazienti con scompenso cardiaco.

Sebbene i pazienti con scompenso cardiaco sintomatico presentino elevate concentrazioni circolanti degli ormoni natriuretici cardiaci, che possiedono una potente azione natriuretica, diuretica e vasodilatante, essi soffrono di ritenzione idrica e di vasocostrizione (1, 2). Questo fenomeno implica una ridotta attività biologica degli ormoni natriuretici cardiaci, cioè una resistenza all'azione periferica degli ormoni natriuretici

cardiaci, specialmente a livello del tubulo renale (2, 60-62, 86, 87). Questa resistenza potrebbe essere dovuta a una alterazione del numero (88, 89) o della funzionalità (90) dei recettori specifici. Un'altra possibile causa potrebbe essere un meccanismo post-recettoriale intracellulare (cioè un antagonismo fisiologico), dovuto all'aumento dell'attività del sistema contro-regolatore con attività sodio ritentiva e vasocostrittrice che include: il sistema renina-angiotensina-aldosterone, il sistema simpatico adrenergico, il sistema adiuiretina-vasopressina e il sistema delle endoteline (2, 62). L'attivazione del sistema contro-regolatorio con attività sodio ritentiva e vasocostrittrice è certamente da considerare come il meccanismo fisiopatologico più importante dello scompenso cardiaco, basti pensare che i farmaci raccomandati dalle linee guida internazionali nei pazienti con scompenso cardiaco svolgono la loro azione terapeutica appunto inibendo l'azione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (inibitori dell'enzima di conversione della angiotensina o del legame della angiotensina al recettore specifico, inibitori del legame al recettore dell'aldosterone o della sua azione a livello tubulare renale) o del sistema simpatico adrenergico (farmaci β -bloccanti) o sono farmaci con una potente azione natriuretica, che agiscono direttamente a livello delle pompe che regolano lo scambio dei fluidi ed elettroliti a livello del tubulo renale (14-16). L'effetto combinato (ad es., quello sodio-ritentivo sulle cellule tubuli renali) dell'attivazione di questi sistemi nei pazienti con scompenso cardiaco sarebbe più potente di quello degli ormoni natriuretici e questo potrebbe innescare un circolo vizioso che potrebbe essere una delle cause della progressione dello scompenso cardiaco.

Tuttavia, accanto a meccanismi fisiopatologici che agiscono rispettivamente a livello recettoriale e post-recettoriale, si potrebbe ipotizzare anche un terzo meccanismo che agirebbe a livello pre-recettoriale (2, 62). Questa ipotesi è supportata da studi che suggeriscono che le modifiche post-traduzionali del proBNP possano essere alterate nei pazienti con scompenso cardiaco (2, 3, 28, 31, 91). I risultati di questi studi hanno dimostrato che molti peptidi BNP-correlati, che circolano nel sangue sia dei soggetti sani che dei pazienti con malattie cardiovascolari, non sono biologicamente attivi (19-23). In particolare, elevatissime concentrazioni (fino a più di 100 volte rispetto ai soggetti sani) del proBNP possono essere misurate nel plasma di pazienti con scompenso cardiaco (54, 81-84). Questi dati potrebbero indicare che nello scompenso cardiaco non vi è un efficiente processo di maturazione post-traduzionale del precursore BNP (59, 86, 87). Un recentissimo studio, che ha misurato la degradazione dei peptidi BNP, NT-proBNP e proBNP in campioni di soggetti sani e pazienti con scompenso cardiaco, sembra supportare questa ipotesi, dimostrando che questo processo enzimatico possa essere effettivamente alterato nei pazienti con scompenso cardiaco (92). Di conseguenza, una grande parte dei peptidi di tipo B, misurati con metodi immunometrici in soggetti sani e in pazienti con malattia cardiovascolare, potrebbe

possedere una ridotta (o addirittura nulla) attività biologica, poiché il proBNP, sebbene si possa legare ai recettori specifici, mostra un'attività biologica inferiore rispetto all'ormone BNP (93). Nei pazienti con scompenso cardiaco si avrebbe l'apparente paradosso che con i metodi considerati specifici per il BNP sono misurati elevatissimi livelli di peptidi natriuretici di tipo B, ma solo una piccola parte di questi peptidi potrebbe effettivamente svolgere un'azione biologica (86, 87).

Questi risultati hanno stimolato la messa a punto di metodi immunometrici specifici per la misurazione del peptide proBNP intatto (54, 78, 79). Da un punto di vista analitico, il proBNP come biomarcatore presenta indubbiamente alcuni vantaggi teorici (ad es., una molecola più stabile e un più alto PM) rispetto all'ormone attivo BNP. Come prospettiva futura, la simultanea misura con due metodi, uno specifico per il precursore intatto proBNP e un altro per il peptide attivo BNP, potrebbe portare a una stima più accurata della produzione/secrezione da parte dei cardiomiociti dei peptidi BNP-correlati e della globale funzionalità endocrina cardiaca rispetto al solo dosaggio di uno dei due peptidi (3, 71). Le informazioni ottenute dalla misura contemporanea di proBNP e BNP con dosaggi specifici potrebbero estendere le nostre attuali conoscenze sui meccanismi fisiopatologici, collegandoli alla progressione della malattia e alla disfunzione endocrina cardiaca. A supporto di questa ipotesi, uno studio condotto su pazienti ambulatoriali con insufficienza cardiaca cronica ha mostrato che la valutazione combinata di BNP e proBNP fornisce ulteriori informazioni nel determinare il rischio di una prognosi avversa, soprattutto in pazienti con bassi valori di BNP (94). Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per stimare e confrontare l'accuratezza diagnostica e prognostica di specifici dosaggi per i diversi peptidi BNP-correlati, BNP, NT-proBNP e proBNP, utilizzandoli da soli o in combinazione.

Da un punto di vista fisiopatologico è anche opportuno sottolineare che la trasformazione periferica del proBNP circolante nell'ormone attivo BNP potrebbe essere regolata per mezzo di specifici meccanismi, che sarebbero meno efficienti in pazienti con insufficienza cardiaca. La scoperta di questi meccanismi potrebbe aprire nuove prospettive nel trattamento dello scompenso cardiaco (2, 59-62). Un nuovo obiettivo farmacologico potrebbe essere la messa a punto di farmaci che stimolino o modulino la maturazione del pro-ormone a ormone attivo BNP nei pazienti con malattie cardiovascolari (59).

Un altro punto di grande rilevanza clinica da considerare per quanto concerne i metodi di dosaggio del BNP nella pratica clinica sono gli intervalli di riferimento. Tutte le più recenti linee guida internazionali suggeriscono livelli decisionali, come per esempio 100 ng/L per diagnosi di esclusione dello scompenso cardiaco acuto, da utilizzare indistintamente per tutti i metodi (14, 16, 17). Tuttavia, come detto, i metodi di dosaggio del BNP presentano delle differenze sistematiche molto ampie. Il livello decisionale di 100

ng/L sembra valido per il metodo Triage Access, il metodo POCT Triage e il metodo CMIA Architect, in quanto questi metodi sembrano misurare livelli di BNP simili tra loro (Figura 5). Inoltre, studi clinici multicentrici condotti su un ampio numero di pazienti hanno validato l'utilità clinica di questo livello decisionali almeno per alcuni di questi metodi, specialmente il metodo POCT (95, 96). Tuttavia, il livello decisionale di 100 ng/L di BNP sembra, almeno teoricamente, sovradimensionato per i metodi AIA-Pack e Advia Centaur, per i quali un livello decisionale più basso sarebbe forse più indicato, considerando che questi metodi misurano concentrazioni di BNP che sono circa la metà di quelle dei metodi precedenti, anche per valori vicino al livello decisionale (Figura 5). Sfortunatamente, almeno a nostra conoscenza, non ci sono studi multicentrici che hanno arruolato un congruo numero di pazienti e che hanno confrontato l'accuratezza diagnostica clinica dei vari metodi di dosaggio del BNP, utilizzando valori ottimali decisionali differenti per ogni metodo testato.

Malattie sistemiche

E' ben noto che elevate concentrazioni circolanti dei peptidi BNP e NT-proBNP possono essere misurate in pazienti con differenti malattie extracardiache (1-3). Moltissimi studi supportano l'ipotesi che gli ormoni natriuretici cardiaci facciano parte della complessa rete che lega fra loro tutti i sistemi di integrazione e di regolazione del corpo, inclusi il sistema nervoso, endocrino e immunologico (1-3, 97, 98). In accordo con questa teoria, il cuore non può più essere considerato un muscolo passivo guidato da impulsi nervosi, endocrini ed emodinamici, ma deve essere visto come un organo in grado di svolgere molteplici funzioni e, in particolare, provvisto di una funzione endocrina, che è in grado di contribuire alla regolazione dell'omeostasi idro-elettrolitica, dell'emodinamica cardiovascolare e, probabilmente, anche modulare la risposta infiammatoria, almeno per quanto riguarda il distretto cardiovascolare (1-3, 59, 99).

Questa ipotesi implica che ci siano due sistemi contrapposti (contro-regolatori) nel nostro organismo: il primo che svolge un'azione favorente la ritenzione sodica, la vasocostrizione vasale, la formazione di trombi intravascolari, l'infiammazione e l'ipertrofia tessutale, mentre l'altro promuove la natriuresi e la vasodilatazione e inibisce la trombosi, l'infiammazione e l'ipertrofia (1-3). I peptidi natriuretici sono i principali effettori del secondo sistema e lavorano in sinergia con l'ossido nitrico (o monossido d'azoto), con alcune prostaglandine e altri peptidi vasodilatatori. In condizioni fisiologiche, gli effetti di questi due sistemi sono regolati reciprocamente per mezzo di svariati meccanismi a "feedback", ampiamente distribuiti in tutti i tessuti e le cellule del nostro organismo.

La stretta associazione tra il sistema natriuretico e quello contro-regolatorio può spiegare l'incremento nei livelli circolanti di peptidi natriuretici in malattie extra-cardiache. Un aumento delle concentrazioni plasmatiche

di BNP è stato frequentemente osservato in malattie respiratorie acute e croniche (100-108), in molte malattie endocrino-metaboliche (97, 98, 109-120), nella cirrosi epatica (121-123), nell'insufficienza renale, sia acuta che cronica (124, 125), nello "shock" settico e nelle malattie infiammatorie croniche (126-130), nell'emorragia subaracnoidea (131-134) e in alcune sindromi paraneoplastiche (135-137). Inoltre, qualsiasi danno alle cellule miocardiche può causare il rilascio di costituenti sarcoplasmatici (inclusi i peptidi natriuretici) nel fluido extra-cellulare, come ad esempio quello dovuto ad agenti cardiotossici, soprattutto i farmaci utilizzati in oncologia (138-144), a traumi accidentali o cardiocirurgici, anche in età neonatale e pediatrica (145, 146), o alla necrosi ischemica (147, 148).

Da un punto di vista clinico è importante sottolineare che livelli sierici elevati di BNP e NT-proBNP, anche in assenza di miocardiopatia clinicamente evidente, sono sempre la spia di un'attivazione del sistema endocrino cardiaco dovuta a uno stress che ha colpito il miocardio. Inoltre, ormai molti studi riportano che elevate concentrazioni di BNP e NT-proBNP sono fattori di rischio indipendente di mortalità (cardiaca e/o totale) o di eventi cardiovascolari maggiori, sia nella popolazione generale (149-152), soprattutto nella popolazione più anziana (153-155), sia in pazienti con embolia polmonare (100-103), ipertensione polmonare primitiva (106), insufficienza renale (124, 125), shock settico (126, 156, 157), amiloidosi (129, 158, 159), diabete mellito (120, 160-164) e anche in pazienti sottoposti a interventi di chirurgia in anestesia generale (165-171).

In conclusione, si può osservare come BNP e NT-proBNP siano da considerarsi dei biomarcatori cardiospecifici, ma non malattia-specifici. Il dosaggio dei peptidi natriuretici cardiaci deve essere quindi considerato come un "marker di stress cardiaco", che può riconoscere cause emodinamiche, ischemiche, infiammatorie, metaboliche, tossiche o traumatiche. In presenza di elevate concentrazioni circolanti dei peptidi natriuretici di tipo B, anche in pazienti che all'esame clinico non presentino chiari segni e sintomi di una miocardiopatia, il clinico è comunque chiamato a cercare una causa che spieghi l'attivazione della funzione endocrina del cuore.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBIOGRAFIA

1. Clerico A. Pathophysiological and clinical relevance of circulating levels of cardiac natriuretic hormones: are they merely markers of cardiac disease? *Clin Chem Lab Med* 2002;40:752-60.
2. Clerico A, Giannoni A, Vittorini S, et al. Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H12-20.
3. Clerico A, Vittorini S, Passino C. Measurement of the pro-hormone of brain type natriuretic peptide (proBNP):

- methodological considerations and pathophysiological relevance. *Clin Chem Lab Med* 2011;4:1949-54.
4. Doust JA, Glasziou PP, Pietrzak E, et al. A systematic review of the diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure. *Arch Intern Med* 2004;164:1978-84.
 5. Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, et al. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *Br Med J* 2005;330:625.
 6. Clerico A, Fontana M, Zyw L, et al. Comparison of the diagnostic accuracy of brain natriuretic peptide (BNP) and the N-terminal part of the propeptide of BNP immunoassays in chronic and acute heart failure: a systematic review. *Clin Chem* 2007;53:813-22.
 7. Ewald B, Ewald D, Thakkinstian A, et al. Meta-analysis of B type natriuretic peptide and N-terminal pro B natriuretic peptide in the diagnosis of clinical heart failure and population screening for left ventricular systolic dysfunction. *Intern Med J* 2008;38:101-13.
 8. Clerico A, Fontana, M, Ripoli A, et al. Clinical relevance of BNP measurement in the follow-up of patients with chronic heart failure. *Adv Clin Chem* 2009;48:163-79.
 9. Felker GM, Hasselblad V, Hernandez AF, et al. Biomarker-guided therapy in chronic heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2009;158:422-30.
 10. Januzzi JL, Troughton R. Are serial BNP measurements useful in heart failure management? Serial natriuretic peptide measurements are useful in heart failure management. *Circulation* 2013;127:500-7.
 11. Troughton R, Felker MG, Januzzi JL Jr. Natriuretic peptide-guided heart failure management. *Eur Heart J* 2014;35:16-24.
 12. Emdin E, Clerico A, Clemenza F, et al. Consensus document. Recommendations for the clinical use of cardiac natriuretic peptides. *J Cardiovasc Med (Ital Heart J)* 2005;6:430-46.
 13. Tang WH, Francis GS, Morrow DA, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine practice guidelines: Clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Circulation* 2007;116:e99-109.
 14. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al. The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008. *Eur J Heart Fail* 2008;10:933-89.
 15. Jessup M, Abraham WT, Casey DE, et al. 2009 focused update: ACCF/AHA Guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009;119:1977-2016.
 16. NICE, Clinical guideline no. 108. Chronic heart failure. National clinical guideline for diagnosis and management in primary and secondary care. August 2010, pag. 1-222.
 17. Thygesen K, Mair J, Mueller C, et al.; Study Group on Biomarkers in Cardiology of the ESC Working Group on Acute Cardiac Care. Recommendations for the use of natriuretic peptides in acute cardiac care: a position statement from the Study Group on Biomarkers in Cardiology of the ESC Working Group on Acute Cardiac Care. *Eur Heart J* 2012;33:2001-6.
 18. Balion C, McKelvie R, Don-Wauchope AC, et al. B-type natriuretic peptide-guided therapy: a systematic review. *Heart Fail Rev* 2014;19:553-64.
 19. Shimizu H, Masuta K, Aono K, et al. Molecular forms of human brain natriuretic peptide in plasma. *Clin Chim Acta* 2002;316:129-35.
 20. Shimizu H, Masuta K, Asada H, et al. Characterization of molecular forms of probrain natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chim Acta* 2003;334:233-9.
 21. Liang F, O'Rear J, Schellenberger U, et al. Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1071-8.
 22. Seferian KR, Tamm NN, Semenov AG, et al. The brain natriuretic peptide (BNP) precursor is the major immunoreactive form of BNP in patients with heart failure. *Clin Chem* 2007;53:866-73.
 23. Hammerer-Lercher A, Halfinger B, Sarg B, et al. Analysis of circulating forms of proBNP and NT-proBNP in patients with severe heart failure. *Clin Chem* 2008;54:858-65.
 24. Luckenbill KN, Christenson RH, Jaffe AS, et al. Cross-reactivity of BNP, NT-proBNP, and proBNP in commercial BNP and NT-proBNP assays: preliminary observations from the IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage. *Clin Chem* 2008;54:619-21.
 25. Apple FS, M. Panteghini M, Ravkilde J, et al. on behalf of the Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC. Quality specifications for B-type natriuretic peptide assays. *Clin Chem* 2005;51:486-93.
 26. Apple FS, Wu AH, Jaffe AS, et al. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine practice guidelines: Analytical issues for biomarkers of heart failure. *Clin Chem* 2007;53:547-51.
 27. Prontera C, Zaninotto M, Giovannini S, et al. Proficiency testing project for brain natriuretic peptide (BNP) and the N-terminal part of the propeptide of BNP (NT-proBNP) immunoassays: the CardioOrmoCheck study. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:762-8.
 28. Clerico A, Vittorini S, Passino C. Circulating forms of the B-type natriuretic peptide prohormone: pathophysiological and clinical considerations. *Adv Clin Chem* 2012;58:31-44.
 29. Clerico A, Zaninotto M, Prontera C, et al. Study Group on Cardiovascular Risk Biomarkers of the Italian Society of Clinical Biochemistry. State of the art of BNP and NT-proBNP immunoassays: The CardioOrmoCheck study. *Clin Chim Acta* 2012;414:112-9.
 30. Franzini M, Masotti S, Prontera C, et al. Systematic differences between BNP immunoassays: Comparison of methods using standard protocols and quality control materials. *Clin Chim Acta* 2013;424:287-91.
 31. Goetze JP. Biosynthesis of cardiac natriuretic peptides. *Results Probl Cell Differ* 2010;50:97-120.
 32. Schellenberger U, O'Rear J, Guzzetta A, et al. The precursor to B-type natriuretic peptide is an O-linked glycoprotein. *Arch Biochem Biophys* 2006;451:160-6.
 33. Seferian KR, Tamm NN, Semenov AG, et al. Immunodetection of glycosylated NT-proBNP circulating in human blood. *Clin Chem* 2008;54:866-73.
 34. Crimmins DL, Kao JL. A glycosylated form of the human cardiac hormone pro B-type natriuretic peptide is an intrinsically unstructured monomeric protein. *Arch Biochem Biophys* 2008;475:36-41.
 35. Semenov AG, Postnikov AB, Tamm NN, et al. Processing of pro-brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site. *Clin Chem* 2009;55:489-98.
 36. Tonne JM, Campbell JM, Cataliotti A, et al. Secretion of glycosylated pro-B-type natriuretic peptide from normal cardiomyocytes. *Clin Chem* 2011;57:864-73.

37. Semenov AG, Tamm NN, Seferian KR, et al. Processing of pro-B-type natriuretic peptide: furin and corin as candidate convertases. *Clin Chem* 2010;56:1166-76.
38. Brandt I, Lambear, AM, Ketelslegers JM, et al. Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-SerPro form. *Clin Chem* 2006;52:82-7.
39. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Harty GJ, et al. Desserine-proline brain natriuretic peptide 3-32 in cardiorenal regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R897-901.
40. Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M, et al. Dipeptidyl-peptidase IV and B-type natriuretic peptide. From bench to bedside. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:248-52.
41. Norman JA, Little D, Bolgar M, et al. Degradation of brain natriuretic peptide by neutral endopeptidase: species specific sites of proteolysis determined by mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175:22-30.
42. Charles CJ, Espiner EA, Nicholls MG, et al. Clearance receptors and endopeptidase 24.11: equal role in natriuretic peptide metabolism in conscious sheep. *Am J Physiol* 1996;271:R373-80.
43. Pankow K, Wang Y, Gembardt F, et al. Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide. *Circ Res* 2007;101:875-82.
44. Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J* 2011;278:1808-17.
45. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Harty GJ, et al. B-type natriuretic peptide 8-32, which is produced from mature BNP 1-32 by the metalloprotease meprin A, has reduced bioactivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296:R1744-50.
46. Toll L, Brandt SR, Olsen CM, et al. Isolation and characterization of a new atrial peptide-degrading enzyme from bovine kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175:886-93.
47. Muller D, Schulze C, Baumeister H, et al. Rat insulin-degrading enzyme: cleavage pattern of the natriuretic peptide hormones ANP, BNP, and CNP revealed by HPLC and mass spectrometry. *Biochemistry* 1992;31:11138-43.
48. Ralat LA, Guo Q, Ren M, et al. Insulin degrading enzyme modulates the natriuretic peptide-mediated signaling response. *J Biol Chem* 2011;286:4670-9.
49. 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 Chimica Acta* 2004;340:163-72.
50. Hawkrigde AM, Heublein DM, Bergen HR 3rd, et al. Quantitative mass spectral evidence for the absence of circulating brain natriuretic peptide (BNP-32) in severe human heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:17442-7.
51. Miller WL, Phelps MA, Wood CM, et al. Comparison of mass spectrometry and clinical assay measurements of circulating fragments of B-type natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 2011;4:335-60.
52. Nishikimi T, Ikeda M, Takeda Y, et al. The effect of glycosylation on plasma N-terminal proBNP-76 levels in patients with heart or renal failure. *Heart* 2012;98:152-61.
53. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, et al. Complexity of molecular forms of B-type natriuretic peptide in heart failure. *Heart* 2013;99:677-9.
54. Giuliani I, Rieunier F, Larue C, et al. Assay for measurement of intact B-type natriuretic peptide prohormone in blood. *Clin Chem* 2006;52:1054-61.
55. Dong N, Chen S, Yang J, et al. Plasma soluble corin in patients with heart failure. *Circ Heart Fail* 2010;3:207-11.
56. Ichiki T, Huntley BK, Heublein DM, et al. Corin is present in the normal human heart, kidney, and blood, with pro-B-type natriuretic peptide processing in the circulation. *Clin Chem* 2011;57:40-7.
57. Knappe S, Wu F, Masikat MR, et al. Functional analysis of the transmembrane domain and activation cleavage of human corin: design and characterization of a soluble corin. *J Biol Chem* 2003;278:52363-70.
58. Semenov AG, Seferian KR, Tamm NN, et al. Human pro-B-type natriuretic peptide is processed in the circulation in a rat model. *Clin Chem* 2011;57:883-90.
59. Del Ry S, Cabiati M, Clerico A. Recent advances on natriuretic peptide system: New promising therapeutic targets for the treatment of heart failure. *Pharmacol Res* 2013;76:190-8.
60. Iervasi G, Clerico A, Berti S, et al. Altered tissue degradation and distribution of atrial natriuretic peptide in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and its relationship with clinical severity of the disease and sodium handling. *Circulation* 1995;91:2018-27.
61. Clerico A, Iervasi G. Alterations in metabolic clearance of atrial natriuretic peptides in heart failure: how do they relate to the resistance to atrial natriuretic peptides? *J Card Fail* 1995;1:323-8.
62. Clerico A, Recchia FA, Passino C, et al. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H17-29.
63. De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, et al. A rapid and important natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci* 1981;28:89-94.
64. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988;332:78-81.
65. Sudoh T, Maekawa K, Kojima M, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:1427-34.
66. Clerico A, Iervasi G, Del Ry S, et al. Immunoassay methods for the measurement of natriuretic cardiac hormones (ANP, BNP, and related peptides) in humans. *J Clin Ligand Assay* 1999;22:194-204.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. Emdin M, Passino C, Clerico A. Natriuretic peptide assays revisited: do we need pro-B-type natriuretic peptide? *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1396-8.
71. Apple FS. B-type natriuretic peptides. Analytical and clinical considerations. *Clin Lab News* 2005:12-4.
72. IFCC document. Analytical characteristics of commercial MR-proANP, BNP and NT-proBNP Assays as per the manufacturer. http://www.ifcc.org/media/102208/NP%20Assay%20Table%20C%20SMCD%20vJuly_2011.pdf.
73. Storti S, Prontera C, Emdin M, et al. Analytical performance and clinical results of a fully automated MEIA system for BNP assay: comparison with a POCT method. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1178-85.
74. Clerico A, Prontera C, Emdin M, et al. Analytical

- performance and diagnostic accuracy of immunometric assays for the measurement of plasma BNP and NT-proBNP concentrations. *Clin Chem* 2005;51:445-7.
75. Prontera C, Storti S, Emdin M, et al. Comparison of a fully automated immunoassay with a point-of-care testing method for B-type natriuretic peptide. *Clin Chem* 2005;51:1274-6.
76. Rawlins ML, Owen WE, Roberts WL. Performance characteristics of four automated natriuretic peptide assays. *Am J Clin Pathol* 2005;123:439-45.
77. Prontera C, Masotti S, Franzini M, et al. Comparison between BNP values measured in capillary blood samples with a POCT method and those measured in plasma venous samples with an automated platform. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:e125-7.
78. Goetze JP, Kastrup J, Pedersen F, et al. 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.
79. Tamm NN, Seferian KR, Semenov AG, et al. Novel immunoassay for quantification of brain natriuretic peptide and its precursor in human blood. *Clin Chem* 2008;54:1511-8.
80. Wu AH, Smith A, Rame E, et al. Analytical assay characterization for 1-108 pro-B-type natriuretic peptide on the BioPlex 2200 analyzer. *Clin Chim Acta* 2009;408:143-4.
81. Macheret F, Boerrigter G, McKie P, et al. Pro-B-type natriuretic peptide 1-108 circulates in the general community: plasma determinants and detection of left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1386-95.
82. Waldo SW, Beede J, Isakson S, et al. Pro-B-type natriuretic peptide levels in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1974-82.
83. Miller WL, Burnett JC Jr, Hartman KA, et al. Role for precursor pro-B type natriuretic peptide in assessing response to therapy and prognosis in patients with decompensated heart failure treated with nesiritide. *Clin Chim Acta* 2009;406:119-23.
84. Røsjø H1, Tamm NN, Kravdal G, et al. Diagnostic utility of a single-epitope sandwich B-type natriuretic peptide assay in stable coronary artery disease: data from the Akershus Cardiac Examination (ACE) 1 study. *Clin Biochem* 2012;45:1269-75.
85. Bargnoux AS, Klouche K, Fareh J, et al. Prohormone brain natriuretic peptide (proBNP), BNP and N-terminal-proBNP circulating levels in chronic hemodialysis patients. Correlation with ventricular function, fluid removal and effect of hemodiafiltration. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1019-24.
86. Clerico A, Emdin M. Endocrine paradox in heart failure: resistance to biological effects of cardiac natriuretic hormones. *Clin Chem* 2004;50:2465-7.
87. Goetze JP. Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: the endocrine heart revisited. *Clin Chem* 2004;50:1503-10.
88. Giannessi D, Andreassi MG, Del Ry S, et al. Possibility of age regulation of the natriuretic peptide C-receptor in human platelets. *J Endocrinol Invest* 2001;24:8-16.
89. Andreassi MG, Del Ry S, Palmieri C, et al. Up-regulation of 'clearance' receptors in patients with chronic heart failure: a possible explanation for the resistance to biological effects of cardiac natriuretic hormones. *Eur J Heart Fail* 2001;3:407-14.
90. Dickey DM, Dries DL, Margulies KB, et al. Guanylyl cyclase (GC)-A and GC-B activities in ventricles and cardiomyocytes from failed and non-failed human hearts: GC-A is inactive in the failed cardiomyocyte. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:727-32.
91. Ichiki T, Huntley BK, Burnett JC Jr. BNP molecular forms and processing by the cardiac serine protease corin. *Adv Clin Chem* 2013;61:1-31.
92. Huntley BK, Sandberg SM, Heublein DM, et al. Pro-B-type natriuretic peptide-1-108 processing and degradation in human heart failure. *Circ Heart Fail* 2015;8:89-97.
93. Dickey DM, Potter LR. ProBNP1-108 is resistant to degradation and activates guanylyl cyclase-A with reduced potency. *Clin Chem* 2011;57:1272-8.
94. Dries DJ, Ky B, Wu A, et al. Simultaneous assessment of unprocessed proBNP 1-108 in addition to processed BNP32 improves risk stratification in ambulatory patients with systolic heart failure. *Circ Heart Fail* 2010;3:220-7.
95. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al. 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.
96. McCullough PA, Nowak RM, McCord J, et al. B-type natriuretic peptide and clinical judgement in emergency diagnosis of heart failure. Analysis from Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study. *Circulation* 2002;106:416-22.
97. Clerico A, Giannoni A, Vittorini S, et al. The paradox of low BNP levels in obesity. *Heart Fail Rev* 2012;17:81-96.
98. Clerico A, Fontana M, Vittorini S, et al. The search for a pathophysiological link between gender, cardiac endocrine function, body mass regulation and cardiac mortality: Proposal for a working hypothesis. *Clin Chim Acta* 2009;405:1-7.
99. Del Ry S, Cabiati M, Clerico A. Natriuretic peptide system and the heart. *Front Horm Res* 2014;43:134-43.
100. Kruger S, Graf J, Merx MW, et al. Brain natriuretic peptide predicts right heart failure in patients with acute pulmonary embolism. *Am Heart J* 2004;147:60-5.
101. Pruszczyk P, Kostrubiec M, Bochowicz A, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with acute pulmonary embolism. *Eur Respir J* 2003;22:649-53.
102. Kucher N, Printzen G, Goldhaber SZ. Prognostic role of brain natriuretic peptide in acute pulmonary embolism. *Circulation* 2003;107:2545-7.
103. Ten Wolde M, Tulevski II, Mulder JW, et al. Brain natriuretic peptide as a predictor of adverse outcome in patients with pulmonary embolism. *Circulation* 2003;107:2082-4.
104. Ando T, Ogawa K, Yamaki K, et al. Plasma concentrations of atrial, brain, and C-type natriuretic peptides and endothelin-1 in patients with chronic respiratory diseases. *Chest* 1996;110:462-8.
105. Maeder M, Ammann P, Rickli H, et al. Elevation of B-type natriuretic peptide levels in acute respiratory distress syndrome. *Swiss Med Wkly* 2003;133:515-8.
106. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, et al. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2000;102:865-70.
107. Leuchte HH, Neurohr C, Baumgartner R, et al. Brain natriuretic peptide and exercise capacity in lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:360-5.
108. Leuchte HH, Holzapfel M, Baumgartner RA, et al. Clinical significance of brain natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:764-70.
109. Kohno M, Horio T, Yasunari K, et al. Stimulation of brain natriuretic peptide release from heart by thyroid hormone.

- Metabolism 1993;42:1059-64.
110. Bernstein R, Midtbo K, Urdal P, et al. Serum N-terminal pro-atrial natriuretic factor 1-98 before and during thyroxine replacement therapy in severe hypothyroidism. *Thyroid* 1997;7:415-9.
 111. Parlapiano C, Campana E, Alessandri N, et al. Plasma atrial natriuretic hormone in hyperthyroidism. *Endocr Res* 1998;24:105-12.
 112. Schultz M, Faber J, Kistorp C, et al. N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) in different thyroid function states. *Clin Endocrinol* 2004;60:54-9.
 113. Jensen KT, Carstens J, Ivarsen P, et al. A new, fast and reliable radioimmunoassay of brain natriuretic peptide in human plasma. Reference values in healthy subjects and in patients with different diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57:529-40.
 114. Sugawara A, Nakao K, Itoh H, et al. Cosecretion of peptides derived from gamma-human atrial natriuretic polypeptide in normal volunteers and patients with essential hypertension and adrenal disorders. *J Hypertens* 1988;6(suppl 4): S327-29.
 115. Fujio N, Ohashi M, Nawata H, et al. Cardiovascular, renal and endocrine effects of a human atrial natriuretic peptide in patients with Cushing's syndrome and primary aldosteronism. *J Hypertens* 1989;7:653-9.
 116. Opocher G, Rocco S, Carpena G, et al. Atrial natriuretic peptide in Cushing's disease. *J Endocrinol Invest* 1990;13:133-7.
 117. Lapinski M, Stepniakowski K, Januszewicz A, et al. Plasma atrial natriuretic peptide concentration in patients with primary aldosteronism. *J Hypertens* 1991;9(suppl 6):S260-1.
 118. Cappuccio FP, Markandu ND, Buckley MG, et al. Raised plasma levels of atrial natriuretic peptides in Addison's disease. *J Endocrinol Invest* 1989;12:205-7.
 119. Straub RH, Hall C, Kramer BK, et al. Atrial natriuretic factor and digoxin-like immunoreactive factor in diabetic patients: their interrelation and the influence of the autonomic nervous system. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3385-9.
 120. Bhalla MA, Chiang A, Epshteyn VA, et al. Prognostic role of B-type natriuretic peptide levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1047-52.
 121. La Villa G, Riccardi D, Lazzeri C, et al. Blunted natriuretic response to low-dose brain natriuretic peptide infusion in non azotemic cirrhotic patients with ascites and avid sodium retention. *Hepatology* 1995;22:1745-50.
 122. Salo J, Jimenez W, Kuhn M, et al. Urinary excretion of urodilatin in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1996;24:1428-32.
 123. Henriksen JH, Gotze JP, Fuglsang S, et al. Increased circulating pro-brain natriuretic peptide (proBNP) and brain natriuretic peptide (BNP) in patients with cirrhosis: relation to cardiovascular dysfunction and severity of disease. *Gut* 2003;52:1511-7.
 124. Vesely DL. Natriuretic peptides and acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F167-77.
 125. McCullough PA, Kuncheria J, Mathur VS. Diagnostic and therapeutic utility of B-type natriuretic peptide in patients with renal insufficiency and decompensated heart failure. *Rev Cardiovasc Med* 2004;5:16-25.
 126. Castillo JR, Zagler A, Carrillo-Jimenez R, et al. Brain natriuretic peptide: a potential marker for mortality in septic shock. *Int J Infect Dis* 2004;8:271-4.
 127. Witthaut 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.
 128. Takemura G, Takatsu Y, Doyama K, et al. Expression of atrial and brain natriuretic peptides and their genes in hearts of patients with cardiac amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:254-65.
 129. Palladini G, Campana C, Klersy C, et al. Serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide is a sensitive marker of myocardial dysfunction in AL amyloidosis. *Circulation* 2003;107:2440-5.
 130. Giannoni A, Tani C, Clerico A, et al. When the heart is burning: Amino-terminal pro-brain natriuretic peptide as an early marker of cardiac involvement in active autoimmune rheumatic disease. *Int J Cardiol* 2011;148:161-7.
 131. McGirt MJ, Blessing R, Nimjee SM, et al. Correlation of serum brain natriuretic peptide with hyponatremia and delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 2004;54:1369-73.
 132. Fukui S, Nawashiro H, Otani N, et al. Focal brain edema and natriuretic peptides in patients with subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 2003;86:489-91.
 133. Kurokawa Y, Uede T, Ishiguro M, et al. Pathogenesis of hyponatremia following subarachnoid hemorrhage due to ruptured cerebral aneurysm. *Surg Neurol* 1996;46:500-7.
 134. Fukui S, Katoh H, Tsuzuki N, et al. Focal brain edema and natriuretic peptides in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Clin Neurosci* 2004;11:507-11.
 135. Mimura Y, Kanauchi H, Ogawa T, et al. Resistance to natriuresis in patients with peritonitis carcinomatosa. *Horm Metab Res* 1996;28:183-6.
 136. Marchioli CC, Graziano SL. Paraneoplastic syndromes associated with small cell lung cancer. *Chest Surg Clin N Am* 1997;7:65-80.
 137. Johnson BE, Damodaran A, Rushin J, et al. Ectopic production and processing of atrial natriuretic peptide in a small cell. *Cancer* 1997;79:35-44.
 138. Hayakawa H, Komada Y, Hirayama M, et al. Plasma levels of natriuretic peptides in relation to doxorubicin-induced cardiotoxicity and cardiac function in children with cancer. *Med Pediatr Oncol* 2001;37: 4-9.
 139. Suzuki T, Hayashi D, Yamazaki T, et al. Elevated B-type natriuretic peptide levels after anthracycline administration. *Am Heart J* 1998;136:362-3.
 140. Nousiainen T, Jantunen E, Vanninen E, et al. Acute neurohumoral and cardiovascular effects of idarubicin in leukemia patients. *Eur J Haematol* 1998;61:347-53.
 141. Nousiainen T, Jantunen E, Vanninen E, et al. Natriuretic peptides as markers of cardiotoxicity during doxorubicin treatment for non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 1999;62:135-41.
 142. Okumura H, Iuchi K, Yoshida T, et al. Brain natriuretic peptide is a predictor of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Haematol* 2000;104:158-63.
 143. Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, et al. Anthracycline-induced cardiomyopathy. Clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:213-20.
 144. Cardinale D, Salvatici M, Sandri MT. Role of biomarkers in cardioncology. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1937-48.
 145. Cantinotti M, Law Y, Vittorini S, et al. The potential and limitations of plasma BNP measurement in the diagnosis, prognosis, and management of children with heart failure due to congenital cardiac disease: an update. *Heart Fail Rev* 2014;19:727-42.
 146. Cantinotti M, Walters HL, Crocetti M, et al. BNP in children with congenital cardiac disease: is there now sufficient evidence for its routine use? *Cardiol Young* 2015;25:424-37.
 147. Mukoyama M, Nakao K, Obata K, et al. Augmented secretion of brain natriuretic peptide in acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;180:431-

- 6.
148. Morita E, Yasue H, Yoshimura M, et al. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:82-91.
149. McDonagh TA, Cunningham AD, Morrison CE, et al. Left ventricular dysfunction, natriuretic peptides, and mortality in an urban population. *Heart* 2001;86:21-6.
150. Freitag MH, Larson MG, Levy D, et al. Plasma brain natriuretic peptide levels and blood pressure tracking in the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2003;41:978-83.
151. Nakamura M, Tanaka F, Onoda T, et al. Gender-specific risk stratification with plasma B-type natriuretic peptide for future onset of congestive heart failure and mortality in the Japanese general population. *Int J Cardiol* 2010;143:124-9.
152. Kara K, Mahabadi AA, Berg MH, et al. Predicting risk of coronary events and all-cause mortality: role of B-type natriuretic peptide above traditional risk factors and coronary artery calcium scoring in the general population: the Heinz Nixdorf Recall Study. *Eur J Prev Cardiol* 2014;21:1171-9.
153. Ueda R, Yokouchi M, Suzuki T, et al. Prognostic value of high plasma brain natriuretic peptide concentrations in very elderly persons. *Am J Med* 2003;114:266-70.
154. Wallen T, Landahl S, Hedner T, et al. Brain natriuretic peptide in an elderly population. *J Intern Med* 1997;242:307-11.
155. Kerola T, Hiltunen M, Kettunen R, et al. Mini-Mental State Examination score and B-type natriuretic peptide as predictors of cardiovascular and total mortality in an elderly general population. *Ann Med* 2011;43:650-9.
156. Piechota M, Barylski M, Hannam S, et al. Natriuretic peptides in septic patients. *Curr Med Chem* 2009;16:4020-31.
157. Turner KL, Moore LJ, Todd SR, et al. Identification of cardiac dysfunction in sepsis with B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Surg* 2011;213:139-46.
158. Palladini G, Foli A, Milani P, et al. Best use of cardiac biomarkers in patients with AL amyloidosis and renal failure. *Am J Hematol* 2012;87:465-71.
159. Ruberg FL, Appelbaum E, Davidoff R, et al. Diagnostic and prognostic utility of cardiovascular magnetic resonance imaging in light-chain cardiac amyloidosis. *Am J Cardiol* 2009;103:544-9.
160. Pfister R1, Tan D, Thekkanal J, et al. NT-pro-BNP measured at discharge predicts outcome in multimorbid diabetic inpatients with a broad spectrum of cardiovascular disease. *Acta Diabetol* 2007;44:91-7.
161. Tsuruda T, Kato J, Sumi T, et al. Combined use of brain natriuretic peptide and C-reactive protein for predicting cardiovascular risk in outpatients with type 2 diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* 2007;3:417-23.
162. Winkler K, Wanner C, Drechsler C, et al. Change in N-terminal-pro-B-type-natriuretic peptide and the risk of sudden death, stroke, myocardial infarction, and all-cause mortality in diabetic dialysis patients. *Eur Heart J* 2008;29:2092-9.
163. van den Hurk K, Alsema M, Kamp O, et al. Slightly elevated B-type natriuretic peptide levels in a non-heart failure range indicate a worse left ventricular diastolic function in individuals with, as compared with individuals without, type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Eur J Heart Fail* 2010;12:958-65.
164. Desai AS, Toto R, Jarolim P, et al. Association between cardiac biomarkers and the development of ESRD in patients with type 2 diabetes mellitus, anemia, and CKD. *Am J Kidney Dis* 2011;58:717-28.
165. Rodseth RN. B type natriuretic peptide—a diagnostic breakthrough in peri-operative cardiac risk assessment? *Anaesthesia* 2009;64:165-78.
166. Rodseth RN, Lurati Buse GA, Bolliger D, et al. The predictive ability of pre-operative B-type natriuretic peptide in vascular patients for major adverse cardiac events: an individual patient data meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:522-9.
167. Karthikeyan G, Moncur RA, Levine O, et al. Is a pre-operative brain natriuretic peptide or N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurement an independent predictor of adverse cardiovascular outcomes within 30 days of noncardiac surgery? A systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:1599-606.
168. Rodseth RN, Biccari BM, Chu R, et al. Postoperative B-type natriuretic peptide for prediction of major cardiac events in patients undergoing noncardiac surgery. Systematic review and individual patient meta-analysis. *Anesthesiology* 2013;119:270-83.
169. Clerico A, Passino C, Emdin M. Surgery casualties: do not leave hearts behind enemy lines. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63:181-3.
170. Clerico A, Emdin M, Passino C. Cardiac biomarkers and risk assessment in patients undergoing major noncardiac surgery: time to revise the guidelines? *Clin Chem Lab Med* 2014;52:959-63.
171. Rodseth RN, Biccari BM, Le Manach Y, et al. The prognostic value of preoperative and postoperative B-type natriuretic peptides (BNP and NT proBNP) in patients having noncardiac surgery. A systematic review and individual patient data meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:170-80.