

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von: Privatdozent Dr. Gerhard Wess

**NT-proBNP bei der Dilatativen
Kardiomyopathie des Dobermanns: Erstellung
von Referenzwerten und Durchführung eines
Testvergleichs sowie einer Follow-Up-Studie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Alexandra Molzahn
aus Hamburg

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Wess

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Meiner Mama

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	2
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Die Dilatative Kardiomyopathie des Dobermanns.....	2
1.1.	Prävalenz	2
1.2.	Ätiologie und Pathophysiologie	2
1.3.	Krankheitsverlauf.....	4
1.4.	Diagnose.....	5
1.4.1.	Elektrokardiographie.....	5
1.4.2.	Echokardiographie	6
1.4.3.	Kardiale Biomarker	7
1.5.	Therapie.....	7
2.	Natriuretische Peptide.....	9
1.1.	Aufbau und Funktion der natriuretischen Peptide.....	9
1.2.	Peptide	13
1.2.1.	B-Typ natriuretisches Peptid	13
1.3.	Verwendung in der Humanmedizin.....	14
1.3.1.	Diagnostik	14
1.3.2.	Risikostratifizierung.....	19
1.3.3.	Monitoring.....	20
1.3.4.	Therapeutischer Einsatz	21
1.4.	Verwendung in der Veterinärmedizin.....	22
1.4.1.	NT-proBNP in der Veterinärmedizin.....	23
1.4.1.1	NT-proBNP beim Hund	23
1.4.1.2.	NT-proBNP bei der Katze.....	27
1.4.2.	BNP in der Veterinärmedizin.....	28
1.5.	NT-proBNP Bestimmung.....	30
1.5.1.	Einflussfaktoren auf die NT-proBNP-Konzentration	31
1.5.2.	Cut-Off-Werte für NT-proBNP beim Hund.....	32
III.	MATERIAL UND METHODEN	34
1.	Patienten.....	34

2.	Einschlusskriterien.....	34
3.	Stadieneinteilung	35
3.1.	Herzgesunde Dobermänner	35
3.2.	Last Normal Stadium	35
3.3.	Okkultes Stadium	36
3.3.1.	Ausschließlich ventrikuläre Extrasystolen.....	36
3.3.2.	Ausschließlich echokardiographische Veränderungen.....	36
3.3.3.	Echokardiographische Veränderungen + ventrikuläre Extrasystolen.....	37
3.4.	Dekompensiertes Stadium.....	37
4.	Untersuchungen.....	37
4.1.	Anamnese	37
4.2.	Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung.....	38
4.3.	Elektrokardiographie	38
4.3.1.	Kurzzeit-Elektrokardiographie.....	38
4.3.2.	Langzeit-Elektrokardiographie.....	38
4.4.	Echokardiographie	39
4.4.1.	Zweidimensionale Echokardiographie	39
4.4.2.	M-Mode Echokardiographie	40
4.4.3.	Simpson-Scheibchen-Summationsmethode	41
4.4.4.	Blutflussdoppler Echokardiographie.....	42
5.	NT-proBNP Messung.....	42
5.1.	Blutabnahme und Blutprobenverarbeitung	43
5.2.	Testprinzip.....	43
5.3.	Testdurchführung.....	44
5.4.	Berechnung der NT-proBNP-Konzentration.....	45
5.5.	Studienablauf.....	45
5.5.1.	Vorversuch.....	46
5.5.2.	NT-proBNP-Stabilität unter Verwendung des Cardiopet-Röhrchens.....	46
5.5.3.	Testvergleich.....	47
5.5.4.	Follow-Up-Studie.....	47
6.	Statistische Auswertung.....	48
6.1.	Einflussfaktoren.....	48
6.2.	Testvergleich.....	48
6.3.	Referenzwert.....	48

6.4.	Vergleich der Krankheitsstadien.....	48
6.5.	Erstellung der Cut-Off-Werte.....	48
IV.	ERGEBNISSE	50
1.	Charakterisierung der Gesamtpopulation.....	50
2.	NT-proBNP	53
2.1.	Einflussfaktoren	53
2.2.	Vorversuch	53
2.3.	Stabilität des NT-proBNPs im Cardiopet-Stabilisatorröhrchen	54
2.4.	Testvergleich	56
2.5.	Referenzwert	61
2.6.	Vergleich der Krankheitsstadien	61
2.7.	Cut-Off-Werte	63
3.	Follow-Up-Studie.....	74
3.1.	Gesunde Hunde	74
3.2.	Kranke Hunde	75
V.	DISKUSSION	80
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	98
VII.	SUMMARY.....	101
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	104
IX.	ANHANG	139
XI.	DANKSAGUNG	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ANOVA	Analysis Of Variance Between Groups
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under The Curve
aVF	Augmented Voltage Left Foot, Goldberger Ableitung
aVL	Augmented Voltage Left Arm, Goldberger Ableitung
aVR	Augmented Voltage Right Arm, Goldberger Ableitung
AV-Klappen	Atrioventrikularklappen
BMI	Body Mass Index
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
CW	Continous Wave
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNP	Dendroaspis Natriuretisches Peptid
DoCM	Dobermann Kardiomyopathie
EDD	Enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels
EDTA	EthylenDiaminTetraAcetat
EDV	Enddiastolisches Volumen
EDVI	Enddiastolischer Volumen Index
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
ESD	Endsystolischer Durchmesser
ESV	Endsystolisches Volumen
ESVI	Endsystolischer Volumen Index
FS	Fractional Shortening = Verkürzungsfraktion
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
IVSd	Durchmesser des interventrikulären Septums in der Diastole
IVSs	Durchmesser des interventrikulären Septums in der Systole
ISACHC	International Small Animal Cardiac Health Council
KG	Kilogramm

LA/Ao	Verhältnis von linkem Atrium zur Aorta
LOG	Logarithmus
LV	Linker Ventrikel
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
LVIDd	Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Diastole
LVIDs	Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Systole
LVPWd	Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand in der Diastole
LVPWs	Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand in der Systole
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-Mode	Motion-Mode
m-RNA	Messenger Ribonukleinsäure
MHz	Megahertz
NEP	Neutrale Endopeptidase
NPR	Natriuretischer Peptidrezeptor
NT-proBNP	N-terminales B-Typ Natriuretisches Peptid
NYHA	New York Heart Association
p	Signifikanzniveau
PCWP	Pulmonary Capillary Wedge Pressure = Pulmonalvenendruck
PDA	Persistierender Ductus Arteriosus
PW	Pulsed Wave
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
ROC	Receiver Operating Characteristic
SPSS®	Statistical Package For The Social Science
SSSM	Simpson-Scheibchensummationsmethode
U.S. FDA	United States Food and Drug Administration
VES	Ventrikuläre Extrasystole
VHS	Vertebral Heart Score
VNP	Ventrikuläres Natriuretisches Peptid

I. EINLEITUNG

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine häufige kardiale Todesursache beim Dobermann (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). In Europa beträgt die kumulative Prävalenz 58,2 % (WESS et al., 2010b). Es tritt ein charakteristischer, aus drei Stadien bestehender, progressiver Verlauf auf. Beginnend mit einem Myokardschaden auf zellulärer Ebene, entwickelt sich eine okkulte Phase, welche beim Auftreten von Symptomen ins klinische Stadium übergeht (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; MEURS et al., 2007). Mit den derzeitigen Untersuchungsmodalitäten ist eine Diagnose des zellulären Myokardschadens nicht möglich. Die okkulte Phase ist assoziiert mit dem Auftreten von ventrikulären Arrhythmien, die zu Synkopen oder Sekudentod führen können, oder einer linksventrikulären systolischen Dysfunktion. Ebenso können beide Abnormalitäten koexistieren. Echokardiographie und 24-Stunden-EKG sind der Goldstandard zur Diagnose der okkulten DCM. Allerdings handelt es sich dabei um aufwendige und damit teure Untersuchungen. Die Bestimmung des N-terminalen B-Typ natriuretischen Peptides (NT-proBNP) wurde bereits bei verschiedenen Fragestellungen erfolgreich eingesetzt und könnte erheblich zur frühzeitigen Diagnose der okkulten DCM beitragen (OYAMA et al., 2008; MORRIS et al., 2009; WESS et al., 2011a). Erschwert wird die Anwendung dieser Untersuchung allerdings durch den Einsatz unterschiedlicher Assays, nicht einheitliches Probenhandling und fraglicher Übertragbarkeit von Referenzwerten auf Ergebnisse verschiedener Tests und verschiedener klinischer Fragestellungen.

Ziel dieser Doktorarbeit war die Erstellung von NT-proBNP Referenzwerten für einen neuen Test zur Verwendung als Screening-Test beim Dobermann, sowie der Vergleich der Resultate zweier unterschiedlicher Assays. Weiterhin wurde die NT-proBNP-Stabilität in Protease-Inhibitor enthaltenden Probenröhrchen evaluiert. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Kontrolle gesunder Hunde, deren NT-proBNP-Werte in einer vorherigen Untersuchung über dem Referenzbereich lagen. Ebenso wurden mittels einer Follow-Up-Studie erkrankte Tiere kontrolliert, deren NT-proBNP-Konzentration bei der erstmaligen Untersuchung unter dem Referenzbereich lag. Ferner erfolgte eine retrospektive Auswertung der NT-proBNP-Testergebnisse der letzten unauffälligen Untersuchung der Hunde vor Erkrankungsbeginn.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die Dilatative Kardiomyopathie des Dobermanns

Die DCM tritt primär bei Hunden großer Rassen auf. Neben Doggen, Irischen Wolfshunden, Portugiesischen Wasserhunden, Neufundländern und Boxern sind Dobermänner eine der am häufigsten betroffenen Hunderassen (DAMBACH et al., 1999; TIDHOLM et al., 2001b).

1.1. Prävalenz

Die Prävalenz der DCM beim Dobermann ist hoch. In Europa beträgt die kumulative Prävalenz der Dobermann Kardiomyopathie (DoCM) 58,2 % (WESS et al., 2010b), in Nordamerika zwischen 45 – 63 % (HAZLETT et al., 1983; O'GRADY & HORNE, 1998; CALVERT & MEURS, 2000). Die Krankheit nimmt mit steigendem Alter zu, bei Hunden über sechs Jahren konnte eine Prävalenz von mehr als 40 % festgestellt werden (WESS et al., 2010b). Das durchschnittliche Alter der Hunde im kongestiven Herzversagen beträgt 6,7 Jahre (CALVERT et al., 1982). Junge Tiere und Welpen sind selten betroffen. Eine juvenile Form der DoCM wurde in einem Wurf Dobermann Welpen festgestellt (VOLLMAR et al., 2003). Die Prävalenz im europäischen Raum für Hunde unter zwei Jahren beträgt 3,3 % (WESS et al., 2010b). Über die geschlechtsspezifische Verteilung wird kontrovers diskutiert. Während in einigen älteren Studien ein häufigeres Auftreten bei Rüden beschrieben wird (CALVERT et al., 1982; CALVERT & BROWN, 1986; JACOBS & CALVERT, 1995; CALVERT et al., 1997a; O'GRADY & HORNE, 1998; CALVERT et al., 2000a) zeigen einige aktuelle Studien eine homogene Geschlechtsverteilung (CALVERT et al., 2000b; MEURS et al., 2007; WESS et al., 2010b).

1.2. Ätiologie und Pathophysiologie

Beim Dobermann handelt es sich um eine familiär gehäuft auftretende Erkrankung, die autosomal dominant vererbt wird. In einer aktuellen Studie wurde herausgefunden, dass Veränderungen im caninen Chromosom fünf mit dem Auftreten der DoCM in Dobermann Populationen in Deutschland und England assoziiert ist (MAUSBERG et al., 2011). Beim Menschen sind bisher Mutationen in über 20 Genen, die unter anderem für Aktin, Tropomyosin, Desmin und andere

Proteine kodieren, bekannt (OLSON et al., 1998; FATKIN & GRAHAM, 2002). Beim Dobermann konnte in einer Studie kein Zusammenhang zwischen fünf, beim Menschen für DCM verantwortlichen, Genmutationen festgestellt werden (MEURS et al., 2008). In einer weiteren Studie wurden die kodierenden Regionen von zehn Genen, die beim Menschen mit familiärer DCM assoziiert sind, auf Mutationen untersucht. Mutationen konnten in diesen kodierenden Regionen nicht nachgewiesen werden. Bei zwei von fünf erkrankten Hunden wurde aber eine Punktmutation in der α -Actinin Sequenz nachgewiesen (O'SULLIVAN et al., 2011). Mutationen in der kodierenden Region für das α -Actinin Gen sind beim Menschen mit Herzversagen assoziiert (MOHAPATRA et al., 2003). Diese Mutation scheint allerdings keine tragende Rolle in der Ätiologie der DoCM zu spielen, da sie nicht bei allen erkrankten Hunden nachgewiesen werden konnte (O'SULLIVAN et al., 2011). In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine 16 Basenpaare betreffende Deletion in der Spleißstellenregion eines Genes, welches für ein mitochondriales Protein codiert und auf Chromosom 14 lokalisiert ist, mit der Entwicklung der DoCM in einigen Dobermann Familien assoziiert ist (MEURS et al., 2010).

Bei der DoCM kann histopathologisch eine fettige Infiltration des Myokards nachgewiesen werden. Dieses führt zur Degeneration von Herzmuskelzellen. Es entsteht eine systolische Dysfunktion des linken Ventrikels (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997b; TIDHOLM & JONSSON, 2005). Eine eindeutige Ursache dafür wurde bisher noch nicht identifiziert. Diskutiert wird eine reduzierte mitochondriale Adenosin-Triphosphat (ATP) Produktion, da bei Dobermännern mit DoCM eine reduzierte ATP- und Myoglobinkonzentration nachgewiesen wurde (MCCUTCHEON et al., 1992). Weiterhin wurde eine veränderte mitochondriale Proteinexpression bei erkrankten Dobermännern nachgewiesen (LOPES et al., 2006b, 2006a). Aus der systolischen Dysfunktion resultiert eine Reduktion des Schlagvolumens, die wiederum zu einer Reduktion des arteriellen Blutdruckes führt. Kompensatorisch erfolgt eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), was zu einer Erhöhung des zirkulierenden Blutvolumens führt. Dadurch entsteht im weiteren Krankheitsverlauf eine linksventrikuläre Dilatation, selten eine biventrikuläre Dilatation, die bei Fortschreiten des Myokardversagens zum kongestiven Herzversagen führt. Das kongestive Herzversagen tritt in dem Augenblick ein, in

dem eine weitere Dilatation des Ventrikels nicht mehr möglich ist. Durch den erhöhten enddiastolischen Druck entsteht ein Lungenödem bei Linksherzversagen und Aszites bei Rechtsherzversagen (KITTLESON & KIENLE, 1998).

1.3. Krankheitsverlauf

Der Krankheitsverlauf der DoCM besteht aus drei Phasen (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997b; CALVERT et al., 1997a; PETRIC et al., 2002; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Im ersten Stadium entstehen Veränderungen nur auf zellulärer Ebene. Weiterhin ist dieses Stadium charakterisiert durch ein morphologisch unauffälliges Herz. Es sind keine elektrokardiographischen Veränderungen nachweisbar, genauso wenig wie klinische Anzeichen einer Herzerkrankung. In der zweiten Phase, dem sogenannten okkulten Stadium, sind die Hunde immer noch klinisch unauffällig. In diesem Stadium können aber sowohl morphologische wie auch elektrokardiographische (EKG) Veränderungen auftreten. Echokardiographisch kann zumeist erst eine systolische und später ebenso eine diastolische linksventrikuläre Dysfunktion nachgewiesen werden. Häufig treten ventrikuläre Extrasystolen (VES) auf (CALVERT et al., 1997b; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 1998a; CALVERT et al., 1998b; O'GRADY & HORNE, 1998; CALVERT et al., 2000a; CALVERT & JACOBS, 2000; CALVERT et al., 2000b; PETRIC et al., 2002; CALVERT & BROWN, 2004; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; O'SULLIVAN et al., 2005; CALVERT & MEURS, 2009). Diese können zu ventrikulären Tachykardien führen, die Kammerflimmern auslösen. 30 % der Hunde sterben in der okkulten Phase am Sekudentod (CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; CALVERT & MEURS, 2009). Die okkulte Phase dauert beim Doberman in der Regel zwischen zwei und vier Jahren. Mit Auftreten von Leistungsinsuffizienz, Dyspnoe, Synkopen und Sekudentod beginnt die dritte, klinische Phase der DoCM. Mehrfach auftretende Synkopen sind selten, meist sterben die Hunde bei der ersten Episode. Sofern die Hunde nicht am Sekudentod sterben, kommt es aufgrund der echokardiographischen Veränderungen zum Auftreten von kongestivem Herzversagen (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Der Krankheitsverlauf scheint bei Rüden und Hündinnen nicht identisch zu sein. Bei Rüden wurden echokardiographische Veränderungen zu einem früheren Zeitpunkt nachgewiesen. Bei Hündinnen dagegen sein VES häufig bis ins hohe Alter die einzige Abnormalität (WESS et al., 2010b).

Die mediane Überlebenszeit für Hunde mit klinischer DoCM beträgt trotz therapeutischer Intervention siebeneinhalb Wochen. Dobermänner, die Vorhofflimmern oder Aszites als Komplikation von links- oder biventrikulärem Herzversagen entwickeln, haben eine noch schlechtere Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von drei Wochen (CALVERT et al., 1997a). Der Einsatz von Pimobendan bei Hunden im kongestiven Herzversagen ist mit einer deutlichen Verlängerung der Überlebenszeit assoziiert. Eine Studie zeigte eine Überlebenszeit der Hunde von 130 Tagen in der Pimobendan Gruppe versus 14 Tagen in der Placebo Gruppe (O'GRADY et al., 2008). Ähnliche Resultate lieferte eine weitere Studie, in der Hunde mit Gabe von Pimobendan 329 Tage lebten. Im Vergleich dazu betrug die Überlebenszeit der Placebo Gruppe 50 Tage (FUENTES et al., 2002).

1.4. Diagnose

Die Echokardiographie und Holter Untersuchung sind der derzeitige Goldstandard zur Diagnose einer DoCM. Allerdings ist eine Diagnose erst bei Vorliegen des okkulten Stadiums möglich (OYAMA et al., 2007). Die frühe Identifikation von Hunden, die erst im Verlauf ihres Lebens die Krankheit entwickeln, wäre besonders für einen möglichen Zuchteinsatz von großer Bedeutung. Ein aussagekräftiger Gentest ist zurzeit noch nicht vorhanden.

1.4.1. Elektrokardiographie

Für die Anzahl der VES in 24 Stunden, die zur Diagnose einer okkulten DoCM führen, gibt es keinen einheitlichen Wert. Abhängig von der jeweiligen Studie wird ein Überschreiten von 50 respektive 100 VES in 24 Stunden als verdächtig betrachtet. Eine Studie demonstrierte, dass bei Hunden mit vielen VES das Risiko einer DoCM deutlich ansteigt. Außerdem erhöht sich das Risiko abhängig vom Vorhandensein von Couplets, Triplets, Salven oder ventrikulären Tachykardien (CALVERT, 1995; CALVERT et al., 2000b; CALVERT & MEURS, 2000, 2009). Ebenso wurde das diagnostische Potential von Kurzzeit EKGs zur Detektion von ventrikulären Arrhythmien bei Dobermännern mit DoCM evaluiert. Es zeigte sich, dass das 5-Minuten-EKG zur Vorhersage von > 100 VES in 24 Stunden eine niedrige Sensitivität, aber eine hohe Spezifität aufwies, wenn in diesen fünf Minuten mindestens eine VES detektiert wurde. Mit steigender Anzahl der VES stieg die Sensitivität ebenfalls an. Aufgrund der hohen Spezifität

(96,7%) und des hohen positiven prädiktiven Wertes (85,6%) sollte bei Vorliegen einer VES im 5-Minuten-EKG unbedingt ein 24-Stunden-EKG durchgeführt werden (WESS et al., 2010d).

1.4.2. Echokardiographie

Im Rahmen der echokardiographischen Untersuchung können anhand von Motion-Mode (M-Mode) Messungen systolische oder diastolische Dysfunktionen festgestellt werden (CALVERT & BROWN, 1986; O'SULLIVAN et al., 2007b). Die dafür verwendeten Parameter sind der linksventrikuläre Durchmesser in der Systole (LVIDs) und in der Diastole (LVIDd) sowie die Verkürzungsfraction (Fractional Shortening = FS). Abhängig von der jeweiligen Studie werden Werte zwischen 4,2 und 5,0 cm für den LVIDd und Werte zwischen 3,8 und 4,0 cm für den LVIDs als physiologisch erachtet (CALVERT et al., 1982; CALVERT & BROWN, 1986; O'GRADY, 1995a, 1995b; CALVERT et al., 1997b; CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; CALVERT & WALL, 2001; O'SULLIVAN et al., 2007b, 2007a). Im Rahmen dieser Studie wurden die folgenden M-Mode Referenzwerte verwendet. Bei Rüden wurde ein LVIDd > 48 mm und ein LVIDs > 36 mm als abnormal betrachtet. Bei Hündinnen wurde ebenfalls ein LVIDs > 36 als pathologisch angesehen, der LVIDd wurde als pathologisch klassifiziert sofern dieser Wert > 46 mm war (MÄURER, 2009). In einer aktuellen Studie wurde die biplane Simpson-Scheibchen-Summations-Methode (SSSM) mit M-Mode Messungen verglichen (WESS et al., 2010c). Bei der SSSM handelt es sich um eine Messung des endsystolischen und des enddiastolischen Volumens, welches auf die Körperoberfläche bezogen den endsystolischen und enddiastolischen Volumen-Index (ESVI, EDVI) ergibt. Diese Methode wird von der American Society of Echocardiography als Methode der Wahl zur Detektion von kardialen Volumenveränderungen in der Humanmedizin angesehen (LANG et al., 2005; LANG et al., 2006). In der Studie von WESS und Mitarbeitern (2010) wurde gezeigt, dass die Simpson Messung der M-Mode Messung überlegen ist und damit bereits früher echokardiographische Veränderungen bei Hunden im okkulten Stadium nachgewiesen werden können. Als Cut-Off-Wert für den EDVI wird > 95 ml/m² und für den ESVI > 55 ml/m² angegeben. Die Sensitivität und Spezifität für den EDVI liegt bei 96,6 % und 96,3 %, für den ESVI bei 94,4 % und 97,4 %. (WESS et al., 2010c). In der Humanmedizin ist ein Verlust der Synchronie der myokardialen Kontraktion

verantwortlich für eine reduzierte systolische Funktion und ein Fortschreiten der Erkrankung. Die inter- und intraventrikuläre Synchronie wurde mittels Gewebedoppler bei gesunden und an DoCM erkrankten Hunden beurteilt. Eine Verschlechterung der longitudinalen Faser-Synchronie war nicht signifikant mit dem Bild einer klinischen DoCM assoziiert, obwohl dieses bei einigen Individuen festgestellt worden ist (LOPEZ-ALVAREZ et al., 2011).

1.4.3. Kardiale Biomarker

Der Einsatz kardialer Biomarker zur Diagnosestellung im okkulten Stadium könnte eine Alternative zur aufwendigen und teuren Ultraschall- und Holteruntersuchung darstellen. Das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) ist bei Hunden diverser Rassen mit okkulter DCM erhöht (OYAMA et al., 2007). Die Ergebnisse von zwei Studien zum Einsatz von NT-proBNP bei der DoCM liefern auch vielversprechende Resultate. Besonders die Vorhersage echokardiographischer Veränderungen ist durch die NT-proBNP Bestimmung möglich (MORRIS et al., 2009; WESS et al., 2011a). An DoCM erkrankte Hunde zeigten eine erhöhte Konzentration von kardialem Troponin-I verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe. Ein Cut-Off-Wert von $> 0,22$ ng/ml hat eine Sensitivität von 79,5 % und eine Spezifität von 84,4 % um alle Formen der DoCM zu detektieren. Die Bestimmung des kardialen Troponin-I erscheint somit als diagnostischer Test vielversprechend, der bei klinisch unauffälligen Hunden das Vorliegen einer Kardiomyopathie nachweisen kann (WESS et al., 2010a).

1.5. Therapie

Für die Therapie gibt es keine einheitlichen Richtlinien. Diese gestaltet sich abhängig von den klinischen Symptomen und den Ergebnissen der kardiologischen Untersuchung (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Beim Auftreten von Synkopen, ventrikulären Tachykardien, schnellen oder polymorphen VES, mehrfachen Couplets, Triplets und Bigemini wird eine antiarrhythmische Therapie empfohlen. Ziel einer antiarrhythmischen Therapie ist die Reduktion der vorliegenden Rhythmusstörungen um 75 %. Die Therapie sollte durch regelmäßige Holteruntersuchungen überwacht werden (CALVERT, 1995; MOISE, 2002). Als wirksame Medikamente zur Dauerbehandlung ventrikulärer Arrhythmien oder hochfrequentem Vorhofflimmern beim Boxer mit arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie haben sich Sotalol, ein

Kalium-Kanal-Blocker mit β -blockierenden Eigenschaften, sowie die Kombination aus dem β -Blocker Atenolol und Mexiletin, einem Antiarrhythmikum der Klasse Ib nach der Vaughan-Williams Klassifizierung, erwiesen (MOISE, 2002). Sollte der Einsatz dieser Medikamente zu keiner ausreichenden Reduktion der Arrhythmien führen, kann die Gabe von Amiodaron erfolgen. Dieses Medikament hat primär Kalium-Kanal blockierende Eigenschaften, ist aber auch ein potenter Natrium-Kanal-Blocker und verfügt zusätzlich über untergeordnete β -blockierende und Kalzium-Kanal blockierende Eigenschaften. Es hat sich in der Humanmedizin als sehr effektives Antiarrhythmikum erwiesen (SINGH et al., 1995; CASTELLI et al., 1999). Gleiches gilt für den Einsatz beim Dobermann. Allerdings sind Nebenwirkungen häufig und besonders die Leberenzymaktivitäten sollten regelmäßig kontrolliert werden (KRAUS et al., 2009). Als Notfallmedikament zur Behandlung hochfrequenter ventrikulärer Tachykardien wird die intravenöse Applikation von Lidocain empfohlen (KITTLESON & KIENLE, 1998).

Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer) gehören zur Standardtherapie bei Hunden im kongestiven Herzversagen (KITTLESON & KIENLE, 1998). Zwei retrospektive Studien zum Einsatz von ACE Hemmern im okkulten Stadium lieferten Hinweise, dass der Beginn des kongestiven Herzversagens dadurch signifikant verzögert werden kann (O'GRADY et al., 1997; O'GRADY et al., 2009).

Durch die Gabe von Pimobendan wird bei Dobermännern im kongestiven Herzversagen eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erzielt. Diese beträgt 329 Tage bei Hunden die Pimobendan erhielten versus 50 Tage in der Placebo Gruppe (FUENTES et al., 2002). Die Mortalität bei Dobermännern im Herzversagen wird durch eine Pimobendan Applikation im Vergleich zur alleinigen Therapie mit ACE Hemmern und Diuretika reduziert. Es wird die sofortige Verabreichung von Pimobendan nach der Diagnose des kongestiven Herzversagens aufgrund einer DoCM empfohlen (O'GRADY et al., 2008).

Zur Therapie des kongestiven Herzversagens wird der Einsatz von Furosemid empfohlen. Dieses kann bei nicht ausreichender Wirkung mit Spironolacton oder Thiaziden kombiniert werden (KITTLESON & KIENLE, 1998). Eine aktuelle Studie evaluierte die Applikation von Spironolacton als zusätzliches Diuretikum neben Furosemid bei Hunden im kongestiven Herzversagen. Es zeigte sich, dass

die zusätzliche Gabe von niedrig dosiertem Spironolacton mit einer durchschnittlichen Dosis von 0,52 mg/kg zu keiner Verlängerung der Überlebenszeit führte (SCHULLER et al., 2011).

2. Natriuretische Peptide

Bei den natriuretischen Peptiden handelt es sich um eine Gruppe von sechs phylogenetisch, funktionell und strukturell verwandten Peptiden. Die Hauptfunktion dieser Peptide besteht in der Regulation der Flüssigkeits-Homöostase und des Blutdruckes (LEVIN et al., 1998; D'SOUZA et al., 2004). Dazu zählen das atriale natriuretische Peptid (ANP), BNP, das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) mit seinen vier verschiedenen Isoformen sowie das Urodilatin und die beim Säugetier nicht bedeutsamen Peptide dendroaspis natriuretisches Peptid (DNP) und ventrikuläres natriuretisches Peptid (VNP) (VAN KIMMENADE & JANUZZI, 2009). DNP konnte bisher nur in der Giftdrüse der Grünen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*) nachgewiesen werden. Seine genaue Funktion ist noch unbekannt (SCHWEITZ et al., 1992). Es konnte allerdings im humanen Myokard eine DNP-vergleichbare Immunreaktivität nachgewiesen werden, deren Konzentration mit dem Schweregrad des Herzversagens korreliert (SCHIRGER et al., 1999; LISY et al., 2001; SINGH et al., 2006). VNP spielt eine wichtige Rolle im Flüssigkeitshaushalt von primitiven Knochenfischen wie Aalen und Salmoniden. Es wird primär von atrialen Myozyten produziert. Im Vergleich zu den anderen natriuretischen Peptiden unterscheidet es sich durch sein aus 14 Aminosäuren bestehendes carboxy-terminales Ende (TAKEI et al., 1991; TAKEI et al., 2007; VAN KIMMENADE & JANUZZI, 2009).

2.1. Aufbau und Funktion der natriuretischen Peptide

Alle natriuretischen Peptide werden beim Säugetier als Präkursor-Pro-Hormone synthetisiert. Das Präkursor-Pro-Hormon wird für jedes natriuretische Peptid von einem separaten Gen kodiert. Die einzelnen Peptide werden gewebsspezifisch synthetisiert und individuell reguliert (LEVIN et al., 1998). Strukturell handelt es sich um Oligopeptidringe bestehend aus 17 Aminosäuren, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (VAN KIMMENADE & JANUZZI, 2009).

Die natriuretischen Peptide wirken durch Interaktion mit hochaffinen

natriuretischen Peptidrezeptoren (NPR) (LEVIN et al., 1998). Die vier verschiedenen Rezeptorsubtypen NPR-A, NPR-B, NPR-C und NPR-D sind identifiziert worden. Alle besitzen eine extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne sowie eine transmembrane Region. Strukturell unterscheiden sich die Rezeptorsubtypen NPR-A und NPR-B durch das Vorhandensein einer intrazellulären Kinase sowie einer Guanylatcyclase, die den anderen beiden Subtypen fehlt (PANDEY, 2005). Durch Aktivierung dieser membrangebundenen Guanylatcyclase kommt es zur Konvertierung von Guanosin triphosphat zu cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) (KISHIMOTO et al., 2009). Dieses ist als Second-Messenger an der weiteren Signaltransduktion beteiligt und vermittelt somit die Wirkung dieser Rezeptorsubtypen (LEVIN et al., 1998). Das bedeutet, dass die natriuretischen Peptide durch Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration wirken (D'SOUZA et al., 2004). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass NPR-A, NPR-B und NPR-D als Tetramer exprimiert werden, NPR-C hingegen als Adimer (PANDEY, 2005). In einer aktuellen Studie wurden das Auftreten und die Verteilung der Rezeptoren bei gesunden Hunden und Katzen untersucht. Im Vergleich zur Katze werden NPR-A und NPR-C in einem größeren Umfang beim Hund exprimiert. Die Expression erfolgt überwiegend im linken und in deutlich geringerem Umfang im rechten Ventrikel. NPR-B wurde nur in sehr geringem Umfang oder teilweise gar nicht nachgewiesen (YAMANE et al., 2011).

NPR-A wird in der Lunge, im Gehirn, im Herzen, in den Nebennieren, in den Nieren und im terminalen Ileum exprimiert (POTTER et al., 2006). Die Bindung der Liganden ANP oder BNP führt zur Bildung von cGMP (LEVIN et al., 1998). Die durch Stimulation von NPR-A auftretenden Wirkungen sind Natriurese, Inhibition der Renin- und Aldosteronfreisetzung, sowie vasorelaxierende, anti-fibrotische, anti-hypertrophe und lusitrope Effekte (LEE & BURNETT, 2007). NPR-A hat die größte Affinität zu ANP, bindet aber auch BNP und in geringerem Maße CNP (LEVIN et al., 1998; INOUE & TAKEI, 2006). NPR-A knock-out-Mäuse entwickeln eine Hypertension, linksventrikuläre Hypertrophie und Fibrose (LOPEZ et al., 1995; POTTER et al., 2006).

NPR-B wird in der Lunge, im Gehirn, in der Haut, in den Nebennieren, in den Nieren, im Uterus und in den Ovarien exprimiert (POTTER et al., 2006). Die Rezeptorstruktur ist nahezu identisch zu NPR-A (LEVIN et al., 1998). Die

extrazellulären Liganden-Bindungsdomänen der beiden Rezeptorsubtypen sind zu 44 % homolog (KOLLER & GOEDEL, 1992). Die Aktivierung des Rezeptors führt ebenfalls zur Bildung von cGMP. Diese erfolgt lediglich durch CNP (LEVIN et al., 1998). NPR-B wird primär in Venen exprimiert, hingegen ist NPR-A in beiden Gefäßtypen vorhanden (WEI et al., 1993). Daher wird durch Aktivierung von NPR-B eine Vasorelaxation mediiert, die einen stärkeren hypotensiven Effekt hat als eine NPR-A Aktivierung. NPR-A führt im Gegensatz primär zu arterieller Vasokonstriktion (WENNBERG et al., 1999). NPR-B knock-out Mäuse entwickeln Nanosomie und Infertilität (TAMURA et al., 2004).

NPR-C wird exprimiert in diversen Organen, dazu gehören Lunge, Gehirn, Herz, Nebennieren, Nieren, Fettgewebe, Plazenta, Venen und Arterien. Im Gegensatz zu NPR-A und NPR-B fehlt die Guanylatcyclase-Domäne, die zur Bildung von cGMP benötigt wird (JAUBERT et al., 1999; MATSUKAWA et al., 1999). Die Resultate einer Studie an einem transgenen Maus-Modell, in welchem NPR-C genetisch entfernt wurde, zeigten eine 66-prozentig erhöhte Halbwertszeit radioaktiv markierten ANPs (JAUBERT et al., 1999; MATSUKAWA et al., 1999). Daher erscheint die Funktion von NPR-C als Clearance-Rezeptor wahrscheinlich (MAACK et al., 1987). Die Clearance erfolgt durch Rezeptor mediierte Endozytose mit darauf folgender lysosomaler Hydrolyse (MAACK, 2006). Anschließend recycelt sich der Rezeptor auf der Zelloberfläche (POTTER et al., 2006). ANP, BNP und CNP binden an diesen Rezeptor mit gleicher Affinität (LEVIN et al., 1998). Neuere Studienergebnisse lassen die Vermutung zu, dass NPR-C antiproliferative Effekte von BNP und CNP auf kardiale Fibroblasten mediiert (ROSE & GILES, 2008).

NPR-D wurde bisher lediglich beim Aal isoliert (KASHIWAGI et al., 1995). Dieser Rezeptorsubtyp wird hauptsächlich im Gehirn des Aals exprimiert. Seine genaue Funktion ist noch unbekannt (TAKEI & HIROSE, 2002; INOUE & TAKEI, 2006).

Die weitere Clearance der natriuretischen Peptide erfolgt durch die neutrale Endopeptidase (NEP), auch als Nephilysin bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine membrangebundene Metalloprotease. Durch Aktivatorsubstanzen wie die Adenylatcyclase, Glukokortikoide, Thrombin, Calcitonin oder durch Zytokine wird die NEP messenger-Ribonukleinsäure (m-RNA) Expression und somit die Aktivität der NEP gesteigert (ROQUES et al., 1993). Ursprünglich wurde die

NEP in der Niere identifiziert (KERR & KENNY, 1974). Zusätzlich wird sie in diversen anderen Geweben wie im Gehirn oder der Lunge exprimiert (TURNER et al., 2001). Ebenso wie der Clearance-Rezeptor NPR-C ist die NEP für die aktive Elimination zirkulierender natriuretischer Peptide zuständig. Diese erfolgt via Hydrolyse. Die NEP-Aktivität variiert für die unterschiedlichen natriuretischen Peptide, wahrscheinlich aufgrund der Tatsache, dass ein längeres carboxy-terminales Ende die Resistenz gegenüber der NEP erhöht. Die Reihenfolge der Affinität der einzelnen natriuretischen Peptide zur NEP stellt sich wie folgt dar: CNP > ANP > BNP > DNP (DUSSAULE et al., 1993; CHEN et al., 2002). DNP ist in einem hohen Maße resistent gegenüber der NEP, wodurch sich die potentielle Möglichkeit eines therapeutischen Einsatzes ergibt (CHEN et al., 2002). Amino-terminale natriuretische Peptidfragmente wie das BNP werden weder von der NEP noch vom NPR-C abgebaut. Dieses erfolgt in stark durchbluteten Organen wie der Niere (GOETZE et al., 2006).

Natriuretische Peptide haben diverse Funktionen im Organismus der Säugetiere. Sie dienen der Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase und haben eine Schutzfunktion gegenüber Endorgan schädigenden Risikofaktoren, wie Hypertension, Remodelling des Myokards und Adipositas (MAACK, 2006).

Eine der Hauptfunktionen der natriuretischen Peptide besteht in der Regulation der Flüssigkeits-Homöostase und des Blutdruckes (LEVIN et al., 1998; D'SOUZA et al., 2004). Dieses erfolgt hauptsächlich durch die Antagonisierung des RAAS (CLARKSON et al., 1996). Die natriuretischen Peptide führen zu einer Vasodilatation der afferenten renalen Arteriolen, sowie einer Vasokonstriktion der efferenten renalen Arteriolen. Dadurch erhöht sich der Filtrationsdruck im Glomerulum und führt zu einem Anstieg der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (MARIN-GREZ et al., 1986). Als Folge kommt es zu einer vermehrten Natriuresis und Diuresis, sowie zu einer erhöhten Calcium und Chlorid Ausscheidung (YUKIMURA et al., 1984). ANP und BNP besitzen beide antiproliferative Eigenschaften. ANP hemmt die Proliferation glatter Muskelzellen in den Gefäßen sowie Angiotensin induzierte Hypertrophie (ABELL et al., 1989; ITOH et al., 1991). BNP hemmt durch seine antifibrotischen Effekte das kardiale Remodelling (TAMURA et al., 2000). Neuere Studien haben die Beteiligung natriuretischer Peptide an inflammatorischen Prozessen gezeigt. Immunzellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten exprimieren natriuretische Peptidrezeptoren (CASSERLY et

al., 2010). Außerdem scheint durch pro-inflammatorische Zytokine ein selektiver BNP Anstieg zu erfolgen (DE BOLD, 2009).

2.2. Peptide

Beim Säugetier sind ANP, Urodilatin, BNP und CNP von Bedeutung. Aufgrund der Fragestellung dieser Doktorarbeit wird im Folgenden nur auf die B-Typ natriuretischen Peptide detailliert eingegangen.

2.2.1. B-Typ natriuretische Peptide

BNP wurde 1988 im Gehirn von Schweinen entdeckt und isoliert (SUDOH et al., 1988). Daher wurde es lange Zeit als „brain-natriuretic-peptide“ bezeichnet. Nachdem es auch in anderen Geweben nachgewiesen werden konnte, wurde es in B-Typ natriuretisches Peptid umbenannt. Es wird hauptsächlich vom Ventrikelmyokard produziert, in geringerem Umfang aber auch vom atrialen Myokard (PORTER et al., 1989; VAN KIMMENADE & JANUZZI, 2009). Die extrakardiale BNP Synthese erfolgt im menschlichen Gehirn und Amniongewebe, sowie im bovinen Nebennierenmark (ESPINER et al., 1995). Die wichtigsten Stimuli für die BNP Synthese sind eine myokardiale Dehnung durch Volumenüberladung, eine Zunahme des kardialen Druckes und Ischämie/Hypoxie. Aber auch endogene vasoaktive Substanzen (Endothelin-1, Angiotensin II, Vasopressin), Neurotransmitter (Adrenalin, Noradrenalin, Acetylcholin), inflammatorische Zytokine (Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin 1 β) und Hormone (Glukokortikoide, Schilddrüsenhormone) führen direkt zur BNP Gen Expression (MATSUKAWA et al., 1999; BOOMSMA & VAN DEN MEIRACKER, 2001; TIDHOLM et al., 2001a). Auch nicht kardial bedingte Veränderungen, bei denen das Blutvolumen erhöht ist, wie eine Zirrhose oder Nephrose führen zur gesteigerten BNP Freisetzung (WONG & BLENDIS, 1994). Aus diesen Stimuli resultiert die Produktion des Prä-Pro-Hormones prä-proBNP bestehend aus 134 Aminosäuren (MARTINEZ-RUMAYOR et al., 2008). Von diesem wird ein aus 26 Aminosäuren bestehendes Signalpeptid abgespalten, was zur Bildung von proBNP führt (SUDOH et al., 1988). ProBNP wird von den proteolytischen Enzymen Corin, welches im Myokard exprimiert wird, oder Furin, welches ubiquitär in diversen Geweben und im Serum vorhanden ist, in zwei Teile gespalten. Dabei handelt es sich um das biologisch inaktive NT-proBNP und das biologisch aktive C-terminale BNP (HUNT et al., 1997;

SAWADA et al., 1997; YAN et al., 2000). NT-proBNP ist das stickstoffhaltige Ende des BNP, während das C-terminale BNP über eine Carboxygruppe verfügt (LEVIN et al., 1998). Obwohl beide Peptide in identischer Konzentration synthetisiert werden, ist die NT-proBNP-Konzentration im Plasma höher. Das deutet auf einen langsameren Abbau und eine höhere Halbwertszeit von NT-proBNP hin (PEMBERTON et al., 2000; MUELLER et al., 2004). Beim Menschen beträgt die Halbwertszeit von NT-proBNP 1 – 2 Stunden, die Halbwertszeit von BNP hingegen liegt bei 22 Minuten (DANIELS & MAISEL, 2007). Beim Hund ist die Halbwertszeit von NT-proBNP nicht bekannt, die von BNP beträgt 90 Sekunden (THOMAS & WOODS, 2003). Die Messung beider Peptide ergibt nahezu identische Informationen. Jedoch ist NT-proBNP bei Raumtemperatur deutlich stabiler (REHMAN & JANUZZI, 2008). Als Limitation muss die biologische Variabilität dieser Peptide in Betracht gezogen werden. Die Konzentrationen beider Peptide unterliegen täglichen und wöchentlichen Schwankungen, ohne Auftreten von nachweisbaren physiologischen oder klinischen Veränderungen (WU et al., 2003; BRUINS et al., 2004; WU, 2006).

2.3. Verwendung in der Humanmedizin

Ende des Jahres 2000 wurde die Bestimmung der BNP Plasma Konzentration als zusätzliche Diagnostik Methode für Herzversagen von der United States Food and Drug Administration (U.S. FDA) zugelassen. Heute hat die Bestimmung der BNP/NT-proBNP Plasma Konzentration eine große Bedeutung als additives Diagnostikum bei Herzerkrankungen. Ebenso wird der Test zur Risikostratifizierung der Morbidität und Mortalität und dem Therapiemonitoring bei kardial erkrankten Patienten verwendet (TROUGHTON et al., 2000; JOURDAIN et al., 2007; BEILBY, 2008; TANG et al., 2008).

2.3.1. Diagnostik

Die Bestimmung von BNP/NT-proBNP ist in Kombination mit dem klinischen Vorbericht, einer klinischen Untersuchung und anderen diagnostischen Tests ein wertvoller Parameter. Jedoch müssen einige Aspekte beachtet werden (TANG et al., 2008). Zum einen variieren die Referenzbereiche in Abhängigkeit von dem verwendeten Assay und der Kontrollpopulation (REDFIELD et al., 2002). Diese Variationen erschweren einen direkten Vergleich verschiedener Studien, so dass beim Heranziehen von Referenzwerten die jeweilige Testmethode betrachtet

werden sollte. Des Weiteren wird die BNP/NT-proBNP Plasmakonzentration von diversen nicht kardialen Faktoren beeinflusst. Diese müssen bei der Evaluation der BNP/NT-proBNP-Testergebnisse zur Diagnosestellung bedacht werden (VAN KIMMENADE & JANUZZI, 2009). Dazu gehören Alter und Geschlecht (REDFIELD et al., 2002), Nierenfunktion (MCLEAN et al., 2003), Habitus (TAYLOR et al., 2006), Schilddrüsenfunktion (SCHULTZ et al., 2004) und Anämie (RALLI et al., 2005). Weitere Faktoren sind frühere Episoden von Herzversagen (CHUNG et al., 2006), Rhythmusstörungen (ROSSI et al., 2000; LOKE et al., 2003), diastolische Dysfunktion, Mitralregurgitation, rechtsventrikuläre Dysfunktion, vorangegangene Herzoperationen und andere strukturelle und funktionelle kardiale Abnormalitäten (CHEUNG, 1997; LUBIEN et al., 2002; MAISEL et al., 2003; TROUGHTON et al., 2004). Eine Besonderheit sind die BNP/NT-proBNP Level bei Obesitas. Obesitas, definiert beim Menschen als erhöhter Body-Mass-Index (BMI), ist assoziiert mit niedrigeren BNP/NT-proBNP-Konzentrationen (HORWICH et al., 2001), trotz höherer linksventrikulärer enddiastolischer Füllungsdrücke (TAYLOR et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass bei Patienten, die sich einer bariatrischen Operation unterzogen haben, die BNP/NT-proBNP-Konzentrationen zunehmen bei gleichzeitiger Abnahme des BMI (VAN KIMMENADE et al., 2006). Diese inverse Korrelation zwischen BNP/NT-proBNP und dem BMI scheint durch eine in der Körpermasse produzierte Substanz, wahrscheinlich durch Androgene, hervorgerufen zu werden (DAS et al., 2005). Klinisch ist die damit verbundene niedrigere Sensitivität und der niedrigere Cut-Off-Wert bei obesen Patienten bedeutend (DANIELS et al., 2006). Ebenso führt eine Langzeit Behandlung mit ACE-Hemmern (BRUNNER-LA ROCCA et al., 1999; MURDOCH et al., 1999), Angiotensin-II Rezeptorblockern (LATINI et al., 2002) und kaliumsparenden Diuretika wie Spironolacton (TSUTAMOTO et al., 2001; ROUSSEAU et al., 2002) zu reduzierten Konzentrationen. Im Gegensatz dazu ist bei Patienten mit reduzierter Nierenfunktion sowohl der BNP wie auch der NT-proBNP-Spiegel im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe gleichen Geschlechts und Alters deutlich erhöht (MCCULLOUGH & SANDBERG, 2003). Diese erhöhte Konzentration wird wahrscheinlich durch die reduzierte renale Clearance verursacht, der genaue Mechanismus ist zurzeit nicht bekannt (MCCULLOUGH et al., 2003; FORFIA et al., 2005).

Eine Übersicht der Differentialdiagnosen für erhöhte und erniedrigte BNP/NT-proBNP-Konzentrationen gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Einflussfaktoren auf die (NT-pro)BNP-Konzentration beim Menschen (LV = linker Ventrikel, LVH = linksventrikuläre Hypertrophie) (REHMAN & JANUZZI, 2008).

Physiologische Faktoren	Alter
	Weibliches Geschlecht
	Adipositas
Kardiovaskuläre Faktoren	Herzversagen
	Ischämie
	Arrhythmien
	Klappenerkrankungen
	Hypertension mit LVH
	Asymptomatische LV Dysfunktion
	Kardiogener Schock
Nichtkardiale Faktoren	Lungenembolie
	Cor pulmonale
	Sepsis
	Septischer Schock
	Pulmonäre Hypertension
	Hyperthyroidismus
	Nierenversagen
	Anämie
	Tumore der Lunge
	Intrazerebrale Hämorrhagie
	Fortgeschrittene Lebererkrankungen
	Exzessiv erhöhte Kortisolspiegel
	Apnoe Syndrom

Auch die vorhandenen Differenzen zwischen BNP und NT-proBNP sollten nicht gänzlich ignoriert werden. Auch wenn diverse Studien eine exzellente statistische Korrelation zwischen BNP und NT-proBNP gezeigt haben (MASSON et al., 2002; YEO et al., 2003), gibt es bezüglich der Halbwertszeit, der inter- und intraindividuellen Variabilität, der Produktion, der Stabilität und renalen Clearance Unterschiede (WANG et al., 2003; WU et al., 2003). Zurzeit können die Ergebnisse der beiden verschiedenen Assay Typen nicht direkt ineinander umgewandelt werden, jedoch scheinen die diagnostischen und prognostischen Fähigkeiten der Tests im klinischen Alltag vergleichbar zu sein (TANG et al., 2008).

Die wichtigste Indikation für den BNP/NT-proBNP-Test ist die Bestätigung der Diagnose des kongestiven Herzversagens (BEILBY, 2008; TANG et al., 2008). Die Bestimmung beider Peptide liefert exzellente Ergebnisse bei der Evaluation akuter Dyspnoe (MAISEL et al., 2002; JANUZZI et al., 2005). In der „Breathing Not Properly“-Studie war die BNP Bestimmung allen anderen anamnestischen und klinischen Befunden sowie Laborparametern bei der Differenzierung von kardial und nicht kardial bedingter Dyspnoe überlegen. Ein Cut-Off-Wert von 100 pg/ml hat eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 76 % (MAISEL et al., 2002). Ähnliche Resultate wurden für die Bestimmung der NT-proBNP-Konzentration zur Differenzierung akuter Dyspnoe berichtet. Im Rahmen der „The N-terminal ProBNP Investigation Of Dyspnea In The Emergency Department (PRIDE)“- Studie wurde ein Cut-Off-Wert von 900 pg/ml für Patienten über 50 Jahre und 450 pg/ml für Patienten unter 50 Jahre festgelegt. Die Sensitivität dieser Cut-Off-Werte liegt bei 91 % (> 50 Jahre) und 93 % (< 50 Jahre), die Spezifität bei 80 % und 95 %. Ebenso wurde in dieser Studie festgestellt, dass ein NT-proBNP-Wert von < 300 pg/ml kongestives Herzversagen ausschließt. Der negative prädiktive Wert liegt bei 99 % (JANUZZI et al., 2005). Beide Studien haben gezeigt, dass die Bestimmung der Biomarker in Kombination mit den Standarduntersuchungen der Bestimmung der Biomarker oder der Standarduntersuchungen alleine deutlich überlegen ist (MAISEL et al., 2002; JANUZZI et al., 2005). Diese Kombination der Diagnostikmethoden führt darüber hinaus zu einem verbesserten Patientenmanagement mit einer Reduktion des stationären Aufenthaltes sowie zu einer reduzierten Rehospitalisierung (MOE

et al., 2007). Auch bei Patienten mit reduzierter Nierenfunktion und akuter Dyspnoe liefert die Bestimmung der beiden natriuretischen Peptide exzellente diagnostische Ergebnisse. MCCULLOUGH und Mitarbeiter (2003) haben gezeigt, dass der Cut-Off-Wert für BNP bei Patienten deren GFR < 60 ml/min liegt, nach oben korrigiert werden muss. So hat sich in diesem Fall ein Cut-Off-Wert von 200 pg/ml als aussagekräftig erwiesen (MCCULLOUGH et al., 2003). Genauso sollte der NT-proBNP Cut-Off-Wert in diesem Fall auf 1200 pg/ml korrigiert werden (JANUZZI et al., 2006). Die Level von BNP und NT-proBNP korrelieren mit den Klassen der New York Heart Association (NYHA) und der Schwere der linksventrikulären Dysfunktion (KRISHNASWAMY et al., 2001; MAISEL et al., 2002; MCCULLOUGH et al., 2002; MUELLER et al., 2004). Daher wird die Bestimmung von BNP und NT-proBNP zur Identifikation von Patienten mit okkulten linksventrikulärer Dysfunktion verwendet. Der diagnostische Nutzen erhöht sich mit der Zunahme der Prävalenz dieser Erkrankung (HEIDENREICH et al., 2004). Daher eignet sich der Einsatz dieses Tests in Patientenpopulationen, deren Risiko aufgrund vorangegangener Herzinfarkte, familiärer Prädisposition und anderen Ursachen deutlich erhöht ist. Ein Routine Screening nicht prädisponierter Patienten liefert keine verwertbaren Ergebnisse (TANG et al., 2007). Ebenso kann durch Bestimmung von BNP/NT-proBNP nicht zwischen systolischer und diastolischer Dysfunktion unterschieden werden, auch wenn generell die BNP/NT-proBNP-Werte bei diastolischer Dysfunktion niedriger sind (KRISHNASWAMY et al., 2001). Des Weiteren sind folgende kardiale Erkrankungen mit einer erhöhten Konzentration der BNP/NT-proBNP Konzentration verbunden: frühere Episoden von Herzversagen (CHUNG et al., 2006), Rhythmusstörungen (ROSSI et al., 2000; LOKE et al., 2003), diastolische Dysfunktion, Mitralregurgitation, rechtsventrikuläre Dysfunktion, vorangegangene Herzoperationen und andere strukturelle und funktionelle kardiale Abnormalitäten (CHEUNG, 1997; LUBIEN et al., 2002; MAISEL et al., 2003; TROUGHTON et al., 2004). Bei Patienten mit akuten Brustschmerzen kardialen Ursprungs ist der BNP Level signifikant höher als bei nicht kardial bedingtem Brustschmerz (BROWN et al., 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass NT-proBNP ein ausgezeichneter Marker für eine myokardiale Ischämie bei Patienten mit Myokardinfarkt ohne ST-Strecken Anhebung ist (OGAWA et al., 2006). Nach einem überstandenen Myokardinfarkt mit erhaltener linksventrikulärer systolischer Funktion können erhöhte BNP Werte auf

intraventrikuläre Überleitungsstörungen hinweisen (CIURASZKIEWICZ et al., 2009). Auch bei der Differenzierung von kardial und nicht kardial bedingten Synkopen erscheint die Messung von NT-proBNP sinnvoll, als Cut-Off-Wert wird 156 pg/ml angegeben (PFISTER et al., 2010).

Auch bei anderen Primärerkrankungen kann das Risiko einer möglichen kardialen Beteiligung anhand der Bestimmung von BNP/NT-proBNP abgeschätzt werden. Bei Patienten mit Diabetes, die aufgrund ihrer Erkrankung ein erhöhtes Risiko zum einen für arteriosklerotische, ischämische Herzveränderungen und zum anderen für eine diabetische Kardiomyopathie haben, ist BNP ein guter Marker für eine präklinische linksventrikuläre diastolische Dysfunktion (ROMANO et al., 2010). Bei Patienten mit Sarkoidose eignet sich der Einsatz von NT-proBNP zum Vorhersagen einer kardialen Beteiligung, nicht jedoch zur Diagnose einer pulmonären Hypertension (HANDA et al., 2010). Im Zusammenhang mit einer pulmonären Embolie wurden die NT-proBNP-Konzentrationen evaluiert. Diese lagen bei allen Patienten mit zentraler pulmonärer Embolie bei > 500 pg/ml, ebenso bei allen Patienten, die an zentraler oder peripherer Embolie verstarben (ALONSO-MARTINEZ et al., 2009). Bei Patienten mit Vorhofflimmern kann BNP als Marker für einen linksatrialen Thrombus bei akutem ischämischen Schlaganfall eingesetzt werden (OKADA et al., 2010). Bei künstlich beatmeten Patienten konnte ein Anstieg der BNP-Konzentration das durch kongestives Herzversagen bedingte Scheitern des Atmungsversuches vorher anzeigen (ZAPATA et al., 2011). Weiterhin scheint der Einsatz sinnvoll bei Kohlenmonoxidvergiftungen. Die NT-proBNP-Konzentration korreliert mit dem Carboxyhämoglobinspiegel und kann somit eine eventuelle Kardiotoxizität anzeigen (DAVUTOGLU et al., 2006). Ein weiteres interessantes Einsatzgebiet ist die Differenzierung von Pleuralergüssen. Es hat sich gezeigt, dass in Pleuralergüssen kardialen Ursprunges die NT-proBNP-Konzentration signifikant höher ist (JANDA & SWISTON, 2010).

2.3.2. Risikostratifizierung

Die Bestimmung von BNP/NT-proBNP wird nicht nur zu diagnostischen Zwecken verwendet, sondern eine weitere Indikation ist die Risikostratifizierung der Patientenmorbidity und -mortality. Dazu können entweder einzelne oder Serienmessungen vorgenommen werden (TANG et al., 2007). Beim Menschen erhöht sich das Todesrisiko um 35 % für jede Zunahme der BNP-Konzentration

um 100 pg/ml über den Referenzbereich (DOUST et al., 2005). Serienmessungen, die eine Zunahme von mehr als 85 % oder eine Reduktion von mehr als 46 % der BNP oder NT-proBNP-Konzentration anzeigen, sind assoziiert mit anschließender Verschlechterung oder Verbesserung des klinischen Zustandes und des Risikolevels (WU et al., 2003; O'HANLON et al., 2007). Bei Patienten mit Mitralklappenregurgitation waren erhöhte BNP Werte mit einem 4,7-fach erhöhtem Risiko für kongestives Herzversagen und Tod verbunden, verglichen mit Patienten mit niedrigeren BNP Werten (PIZARRO et al., 2009). Außerdem korrelierten die BNP/NT-proBNP Level mit der Schwere der Mitralregurgitation (MOE et al., 2007). Durch die Bestimmung von BNP/NT-proBNP erhält man zusätzliche Informationen über die Prognose, unabhängig von konventionellen Diagnostikmethoden, wie klinischen Symptomen, Schwere der Mitralklappenregurgitation oder Herzgröße (DETAINT et al., 2005; DETAINTE et al., 2006; PIZARRO et al., 2009). Bei akutem Koronarsyndrom hat sich BNP als Indikator für akutes Herzversagen erwiesen (SINCLAIR et al., 2007). Auch nach diversen kardialen Eingriffen ist die BNP/NT-proBNP Messung ein guter prognostischer Parameter für postoperative Komplikationen oder postoperatives Vorhofflimmern (ELIASDOTTIR et al., 2008; SARZI BRAGA et al., 2008). Auch bei pädiatrischen Patienten scheint BNP wertvolle Informationen über das Outcome zu liefern. Kinder, die älter als zwei Jahre sind, mit moderaten Symptomen des kongestiven Herzversagens und einer BNP Konzentration > 140 pg/ml haben ein höheres Risiko für ein schlechtes Outcome (AUERBACH et al., 2010).

2.3.3. Monitoring

Der Einsatz von BNP/NT-proBNP zum Monitoring des Therapieerfolges wird kontrovers diskutiert. In den aktuellsten Guidelines zum Einsatz kardialer Biomarker bei Herzversagen von 2007 wurde ein Routinetest zur weiteren Therapiegestaltung, z.B. weiterer Einsatz von Diuretika oder Anpassung der Medikamentendosis, noch nicht empfohlen (TANG et al., 2007). Eine 1600 Patienten umfassende Meta-Analyse hat gezeigt, dass das Mortalitätsrisiko um 31 % gesenkt werden konnte bei Einsatz einer von Biomarkermessungen gestützten Therapie. Dieses war nicht verbunden mit der Zunahme möglicher Nebenwirkungen (FELKER et al., 2009). In der „The BNP-Assisted Treatment To Lessen Serial Cardiac Admissions And Death“-Studie (BATTLE-SCARRED-

Trial) wurde ein verbessertes Outcome bei NT-proBNP gestützter Therapie nur bei Patienten < 75 Jahren festgestellt (LAINCHBURY et al., 2009). Auch der BNP/NT-proBNP gestützte Einsatz von Carvedilol bei Patienten mit ischämischer linksventrikulärer Dysfunktion hat kontroverse Ergebnisse geliefert. RICHARDS und Mitarbeiter (1999,2001) berichteten, dass Patienten deren NT-proBNP-Konzentration über dem Medianwert lag, von der Carvedilol Gabe profitierten, im Gegensatz zu Patienten deren NT-proBNP-Konzentration darunter lag (RICHARDS et al., 1999; RICHARDS et al., 2001). Gegensätzlich dazu sind die Ergebnisse des „COPPERNICUS-TRIALS“, wo bei größeren Patientenzahlen alle Patienten von der Carvedilol Therapie zu profitieren schienen, unabhängig von ihrer NT-proBNP-Konzentration (HARTMANN et al., 2004). Im Rahmen der PRIMA (Can PRo-brain-natriuretic peptide guided therapy of chronic heart failure IMProve heart fAilure morbidity and mortality-) Studie wurde evaluiert, ob die Therapie des chronischen Herzversagens durch begleitende NT-proBNP Serienmessungen und der Bestimmung eines individuellen NT-proBNP-Wertes zu einem verbesserten Outcome führt. Dabei wurde gezeigt, dass durch NT-proBNP Serienmessungen instabile NT-proBNP Level als Indikator für bevorstehende Zwischenfälle herangezogen werden können. Jedoch führte eine damit verbundene Optimierung der Therapie zu keiner statistisch signifikanten Reduktion der Morbidität und Mortalität (EURLINGS et al., 2010).

2.3.4. Therapeutischer Einsatz

Auch wenn die vermehrte Synthese der BtNPs in Zuständen akuter Volumenüberladung alleine nicht ausreicht, den euvolämischen Zustand wiederherzustellen, wird versucht, die vorteilhaften Effekte therapeutisch zu nutzen. Nesiritide, ein synthetisches rekombinantes humanes BNP wurde zur Therapie des kongestiven Herzversagens entwickelt (LEE & BURNETT, 2007). Die Applikation von Nesiritide bewirkt eine ausgewogene arterielle und venöse Dilatation, was zur Reduktion von Vor- und Nachlast führt. Außerdem erhöht Nesiritide den renalen Blutfluss, was zu vermehrter GFR und Natriuresis sowie Diuresis führt (MILLS et al., 2002). Nesiritide wurde in mehreren klinischen Studien an über 700 stationären Patienten mit akutem kongestiven Herzversagen evaluiert (HOBBS et al., 1996; ABRAHAM et al., 1998; MILLS et al., 1999; COLUCCI et al., 2000; 2002). Es wurde gezeigt, dass es zu einer schnellen Reduktion des systemischen Gefäßwiderstandes sowie des Pulmonary Capillary

Wedge Pressures führt. Dieses war assoziiert mit einer deutlichen Verbesserung des kongestiven Herzversagens (MILLS et al., 2002). Allerdings ist der Einsatz von Nesiritide nicht unumstritten. Zwei Meta-Analysen haben zum einen eine Verschlechterung der renalen Funktion (SACKNER-BERNSTEIN et al., 2005b) und zum anderen eine erhöhte Mortalität gezeigt (SACKNER-BERNSTEIN et al., 2005a). Außerdem war die Behandlung mit Nesiritide mit einem um 74 % erhöhten Todesrisikos innerhalb eines Kurzzeit-Follow-Ups von 30 Tagen assoziiert (SACKNER-BERNSTEIN et al., 2005a). Dieses wurde in einer aktuellen Meta-Analyse von ABRAHAM und Mitarbeitern (2010) jedoch widerlegt (ABRAHAM et al., 2010). Trotz der kontroversen Ergebnisse ist Nesiritide von der U.S. FDA zum therapeutischen Einsatz bei akutem kongestiven Herzversagen zugelassen (FEDERICO, 2010). Im Rahmen der „Acute Study Of Clinical Effectiveness Of Nesiritide In Decompensated Heart Failure“ (ASCEND HF Trial) wurde der Einfluss einer Nesiritide Behandlung auf Morbidität und Mortalität evaluiert. In diese Studie sind 7000 Patienten weltweit im Zeitraum von 2007-2010 eingeschlossen worden, die Ergebnisse stehen noch nicht zur Verfügung (HERNANDEZ et al., 2009).

2.4. Verwendung in der Veterinärmedizin

Besonders in der Kleintiermedizin hat sich die Bestimmung der natriuretischen Peptide etabliert. Zu Beginn des Einsatzes in der Tiermedizin erschien die ANP Bestimmung der Bestimmung von BNP/NT-proBNP überlegen zu sein. Die Verwendung humaner BNP Assays zeigte im Vergleich zu ANP schlechtere Resultate (ASANO et al., 1999). Dieses wird auf die geringe Homologie zwischen caninem und humanem prä-proBNP zurückgeführt, welche nur bei 45 % liegt. Im Gegensatz dazu beträgt die Homologie zwischen caninem und humanem prä-proANP 87 % (OIKAWA et al., 1985; LIU et al., 2002). Außerdem ist BNP aufgrund seiner extrem kurzen Halbwertszeit von nur 90 Sekunden sehr instabil (THOMAS & WOODS, 2003). Durch Verwendung von caninen BNP Assays wurden aussagekräftigere Resultate erzielt. So konnte durch die BNP Bestimmung die Differenzierung von Herzversagen und extrakardialen Erkrankungen als Ursache für klinische Symptome erfolgen. Ebenso korrelierte der BNP Wert mit der Schwere des Herzversagens (DEFRANCESCO et al., 2007). OYAMA und Mitarbeiter (2008) demonstrierten ähnliche Resultate für die NT-proBNP Bestimmung bei Hunden (OYAMA et al., 2008). Aufgrund seiner besseren

Stabilität hat sich NT-proBNP als exzellenter kardialer Biomarker erwiesen. Sein diagnostischer und prognostischer Wert ist bei Hunden und Katzen der NT-proANP Bestimmung überlegen (CONNOLLY et al., 2008; TARNOW et al., 2009).

2.4.1. NT-proBNP in der Veterinärmedizin

Außer beim Hund und bei der Katze ist der NT-proBNP-Test noch nicht etabliert. Es sind kaum Studien bei anderen Tierarten vorhanden. Eine Studie an Ratten hat ebenfalls gezeigt, dass die NT-proBNP-Konzentration bei Tieren im Herzversagen verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant ansteigt (FU et al., 2009). Auch bei Schafen ist NT-proBNP als Marker für Volumenüberladung und Dekompensation gut geeignet (PEMBERTON et al., 1998).

2.4.1.1. NT-proBNP beim Hund

Ebenso wie in der Humanmedizin ist eine häufige Indikation für eine NT-proBNP Bestimmung die Differenzierung von kardial und extrakardial bedingter Dyspnoe (DEFRANCESCO et al., 2007; PROSEK et al., 2007; FINE et al., 2008; OYAMA et al., 2009). FINE und Mitarbeiter (2008) untersuchten 46 Hunde mit respiratorischen Symptomen. Es stellte sich heraus, dass die mediane NT-proBNP-Konzentration bei Hunden im Herzversagen signifikant höher war als bei Hunden mit respiratorischen Erkrankungen wie Bronchitis, Infektionen oder Neoplasie. Bei allen Hunden mit einer respiratorischen Erkrankung lag die NT-proBNP-Konzentration < 800 pmol/l, somit lag eine Spezifität von 100 % vor. Bei 92 % der Hunde im Herzversagen wurde ein NT-proBNP-Wert > 1400 pmol/l festgestellt (FINE et al., 2008). In einer anderen Studie konnte anhand eines NT-proBNP Cut-Off-Wertes von 1158 pmol/l zwischen kardial und extrakardial bedingter Dyspnoe unterschieden werden (OYAMA et al., 2009). NT-proBNP-Konzentrationen im Bereich um den in dieser Studie bestimmten Cut-Off-Wert von 1158 pmol/l haben einen niedrigeren prädiktiven Wert als extreme Werte im oberen oder unteren Abschnitt des Messbereichs. Daher kann bei einer Konzentration von < 900 pmol/l von einer respiratorischen Erkrankung und bei einer Konzentration von > 1800 pmol/l vom kongestiven Herzversagen ausgegangen werden. Werte im Bereich zwischen 900 - 1800 pmol/l sollten aufgrund ihrer geringeren Aussagekraft vorsichtig interpretiert werden (OYAMA et al., 2009; OYAMA & SINGLETARY, 2010). Ebenso wie in der

Humanmedizin korreliert die Wahrscheinlichkeit des Herzversagens mit der Höhe der NT-proBNP-Konzentration (STEINHART et al., 2009; OYAMA & SINGLETARY, 2010).

Eine weitere potentielle Indikation scheint der Einsatz zur Diagnostik von asymptomatischen oder okkulten Krankheitsstadien zu sein. Besonders im Falle einer okkulten DCM sind charakteristische klinische Symptome wie Rhythmusstörungen nicht immer vorhanden. Außerdem ist der diagnostische Goldstandard bestehend aus Kurzzeit-EKG, 24-Stunden-EKG und Echokardiographie relativ teuer und es wird diverses Equipment benötigt. Allerdings scheinen BNP sowie NT-proBNP nur unter bestimmten Bedingungen dafür geeignet zu sein (OYAMA & SINGLETARY, 2010). Bei Dobermännern mit okkulten DCM hat der Einsatz eines BNP Tests eine relativ hohe Sensitivität (95,2 %) aber eine niedrige Spezifität (61,9 %) ergeben. Das bringt die Gefahr vieler falsch-positiver Ergebnisse mit sich und limitiert den Einsatz des Tests (OYAMA et al., 2007). Eine aktuelle Studie zum Einsatz von NT-proBNP beim Dobermann ergab bei Verwendung eines Cut-Off-Wertes von 400 pmol/l eine Sensitivität (81,1 %) und Spezifität (75 %) zur Erkennung aller Krankheitsstadien. Wurde die Sensitivität nur bezogen auf die Erkennung von Echoveränderungen betrachtet, stieg diese auf 90 % an. Die Spezifität lag in dem Fall bei 75 %. Wurde ein Cut-Off-Wert von 550 pmol/l zur Erkennung von Echoveränderungen verwendet, stieg die Spezifität auf 90,3 % (WESS et al., 2011a). Die Kombination von Holteruntersuchung und NT-proBNP Messung hat in einer weiteren Studie eine 100-prozentige Sensitivität und eine 93,2-prozentige Spezifität ergeben (MORRIS et al., 2009). Daher erscheint die Kombination einer Holteruntersuchung und einer NT-proBNP Messung eine sinnvolle diagnostische Methode darzustellen (OYAMA & SINGLETARY, 2010). Aufgrund der hohen Sensitivität eignet sich dieser Test besonders zum Einsatz in Populationen mit einer hohen Inzidenz der Erkrankung. Studienergebnisse aus der Humanmedizin zeigten, dass der BNP Test bei Menschen maximal effektiv ist, wenn in der untersuchten Population die Prävalenz der Erkrankung > 1 % liegt (HEIDENREICH et al., 2004). Die Prävalenz der okkulten DoCM in den USA liegt zwischen 45 % und 63 % (HAZLETT et al., 1983; O'GRADY & HORNE, 1998; CALVERT & MEURS, 2000). In Europa liegt die Gesamtprävalenz der Dobermannkardiomyopathie bei 58,3 % (WESS et al., 2010b). Ein Routine

Screening mittels NT-proBNP Bestimmung zur Diagnose der okkulten DCM beim Hund wird zur Zeit nicht empfohlen, es werden weitere Studien benötigt (OYAMA & SINGLETARY, 2010).

In welchem Umfang die NT-proBNP Messung zur Vorhersage des Morbiditäts- und Mortalitätsrisikos beitragen kann, muss noch vollständig geklärt werden. Ergebnisse einiger Studien bei Hunden mit und ohne klinischen Symptomen zeigten, dass die NT-proBNP-Konzentration mit Fortschreiten der Erkrankung ansteigt (OYAMA et al., 2008; TARNOW et al., 2009). Daher scheint es prinzipiell möglich zu sein, durch die NT-proBNP Bestimmung den Beginn des Herzversagens und den Todeszeitpunkt vorherzusagen (OYAMA & SINGLETARY, 2010). In einer prospektiven Studie mit an asymptomatischer Mitralklappenendokardiose erkrankten Hunden war NT-proBNP der einzige von acht Parametern, der den Todeszeitpunkt oder Beginn des kongestiven Herzversagens in den folgenden zwölf Monaten vorhersagen konnte (CHETBOUL et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie mit 100 Hunden, die an Mitralklappenendokardiose erkrankt waren. Lediglich die Bestimmung der NT-proBNP-Konzentration sowie der linksventrikuläre Durchmesser waren prognostisch für die allgemeine sowie die kardiale Mortalität innerhalb der dreijährigen Studiendauer (MOONARMART et al., 2010). Für jede Zunahme der NT-proBNP-Konzentration um 100 pmol/l stieg das allgemeine Mortalitätsrisiko um 7 %. Die mediane Überlebenszeit von Hunden, deren NT-proBNP-Konzentration größer als 738,5 pmol/l war, lag bei 318 Tagen versus 786 Tagen bei NT-proBNP-Konzentrationen zwischen 391,1 und 738,5 pmol/l. Die Analyse an Tag 351 der Subpopulation der Hunde, die aufgrund kardialer Ursachen starben, ergab, dass nur Hunde mit einem Wert von > 740 pmol/l ein signifikant erhöhtes Mortalitätsrisiko aufwiesen. Die mediane Überlebenszeit der Hunde mit niedrigerer NT-proBNP-Konzentration konnte nicht bestimmt werden, da mehr als die Hälfte dieser Hunde am Studienende noch am Leben waren (MOONARMART et al., 2010).

SERRES und Mitarbeiter (2008) fanden heraus, dass die NT-proBNP-Konzentration eng mit dem klinischen Schweregrad der Mitralklappenendokardiose bei Hunden im Herzversagen korreliert. Des Weiteren konnte in dieser Studie der NT-proBNP-Test mit einer Sensitivität von 80 % und einer Spezifität von 73 % die Mortalität in den folgenden sechs Monaten

vorhersagen. Dabei waren NT-proBNP-Konzentrationen > 1500 pmol/l mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert (SERRES et al., 2009). Weitere Studien werden auch hier benötigt, um Cut-Off-Werte und geeignete Patientenpopulationen besser definieren zu können. Dennoch scheint die Vorhersage des Outcomes und des Mortalitätsrisikos durch den NT-proBNP-Test von Patienten mit Mitralklappenendokardiose eine große potentielle Bedeutung zu haben (OYAMA & SINGLETARY, 2010). Weiterhin korrelierten bei Hunden mit Aortenstenose die NT-proBNP-Werte mit dem linksventrikulären enddiastolischen Druck und der Dicke des interventrikulären Septums in der Diastole (IVSd) (HORI et al., 2008). Die Korrelation zwischen NT-proBNP und weiteren Echoparametern sowie dem Vertebral Heart Score (VHS) wird kontrovers diskutiert. TARNOW und Mitarbeiter (2009) zeigten eine positive Korrelation zwischen dem Verhältnis des linken Atriums zur Aorta (LA/Ao) (TARNOW et al., 2009). Ebenso wurde in einer anderen Studie eine positive Korrelation des VHS mit der NT-proBNP-Konzentration demonstriert (OYAMA et al., 2008). Eine Studie von FINE und Mitarbeitern (2008) konnte beide Ergebnisse nicht bestätigen (FINE et al., 2008).

Eine weitere Indikation für die NT-proBNP Messung ist, ebenso wie in der Humanmedizin, die von Biomarker Messungen begleitete Therapie. Ergebnisse einer veterinärmedizinischen Pilotstudie deuten daraufhin, dass Schwankungen der NT-proBNP-Konzentration mit Veränderungen der Therapie übereinstimmen. Im Rahmen dieser Studie wurden Hunde, die aufgrund einer schweren Mitralklappenendokardiose Furosemid erhielten, zusätzlich durch NT-proBNP Serienmessungen überwacht. Basierend auf den Ergebnissen der konventionellen Untersuchungsmethoden (klinische Untersuchung, Blutuntersuchung, Echokardiographie und Thoraxröntgen) und geblindet gegenüber den NT-proBNP Resultaten, mussten sich die Untersucher für eine erhöhte, reduzierte oder unveränderte Furosemid Dosis entscheiden. Patienten, die eine höhere NT-proBNP-Konzentration aufwiesen, hatten auch eine erhöhte Furosemid Dosis erhalten. Außerdem zeigten diese Patienten häufiger radiologisch Hinweise auf kongestives Herzversagen. Die gleichen Beobachtungen wurden für den umgekehrten Fall gemacht. Die Patienten mit einem niedrigeren NT-proBNP-Spiegel hatten niedrigere Furosemid Dosen erhalten. Ebenso war bei diesen Patienten radiologisch kein Hinweis auf kongestives Herzversagen vorhanden

(ACHEN et al., 2009). Bei Hunden mit einer pulmonären Hypertension, die Pimobendan erhielten, war NT-proBNP als Kontrollparameter einsetzbar. Die echokardiographisch nachweisbare Reduktion des Druckgradienten führte gleichfalls zur Reduktion der NT-proBNP-Konzentration (ATKINSON et al., 2009). Diese Resultate lassen vermuten, dass die Ergebnisse von NT-proBNP Serienmessungen Therapieentscheidungen in Zukunft positiv beeinflussen könnten. Aber auch in diesem Fall bedarf es weiterer Studien, ein Routinetest wird zur Zeit nicht empfohlen (OYAMA & SINGLETARY, 2010). Im Fall des chirurgischen Verschlusses eines *Persistierenden Ductus Arteriosus Botalli* (PDA) ist eine Reduktion der NT-proBNP Plasma Konzentration mit einem erfolgreichen Verschluss assoziiert (ARAMAKI et al., 2010).

2.4.1.2. NT-proBNP bei der Katze

Ebenso wie in der Humanmedizin und bei Hunden, kann auch bei Katzen anhand der NT-proBNP-Konzentration eine kardiale Dyspnoe (durch kongestives Herzversagen bedingt durch verschiedene feline Kardiomyopathien) von einer nicht kardial bedingten Dyspnoe differenziert werden (WESS, 2008; CONNOLLY et al., 2009b; FOX et al., 2009). Außerdem zeigte sich, dass Katzen mit primären respiratorischen Erkrankungen und ohne Anzeichen einer linksventrikulären Hypertrophie höhere NT-proBNP-Konzentrationen als die gesunde Kontrollpopulation aufwiesen (WESS, 2008; CONNOLLY et al., 2009b). Dieses könnte durch eine pulmonäre Hypertension bedingt sein (CONNOLLY et al., 2009b). Mehrere Studien ergaben ebenfalls signifikant erhöhte NT-proBNP-Konzentrationen für Katzen im Herzversagen (FOX et al., 2009; HSU et al., 2009; ZIMMERING et al., 2009). Laut den Resultaten einer weiteren Studie kann anhand der NT-proBNP-Konzentration zwischen asymptotischen Katzen, solchen mit kongestivem Herzversagen und der gesunden Kontrollpopulation unterschieden werden (CONNOLLY et al., 2008). Die Fähigkeit des Tests zwischen gesunden Kontrollkatzen und an feline Kardiomyopathien erkrankten, aber sich nicht im Herzversagen befindenden Katzen, unterscheiden zu können, wird kontrovers diskutiert. Diverse Publikationen legen nahe, dass die NT-proBNP-Konzentration zur Unterscheidung von asymptotischen Katzen und gesunden Kontrollkatzen herangezogen werden kann (CONNOLLY et al., 2008; ZIMMERING et al., 2009; WESS et al., 2011b). Diese Resultate werden in einer Studie von MACLEAN und Mitarbeitern (2006) jedoch nicht bestätigt

(MACLEAN et al., 2006). Weitere Studien ergaben, dass durch den NT-proBNP-Test Katzen mit echokardiographischen Veränderungen, die sich noch nicht im Herzversagen befinden, identifiziert werden können (CONNOLLY et al., 2008; WESS et al., 2011b). Ebenso konnte bei asymptomatischen Katzen eine kardiale Vergrößerung anhand der NT-proBNP-Konzentration nachgewiesen werden (TOMINAGA et al., 2011). Eine Studie von HSU und Mitarbeitern (2009) bestätigte, dass asymptomatische Katzen in einem hochgradigen Erkrankungsstadium mit hoher Sensitivität und Spezifität identifiziert werden können. Jedoch traf das nicht auf gering- oder mittelgradige Befunde zu, da diese Katzen im Vergleich zur gesunden Kontrollpopulation keine signifikant erhöhten NT-proBNP-Konzentrationen aufwiesen (HSU et al., 2009). In der Studie von WESS et al. wurde allerdings gezeigt, dass auch Katzen mit einer milden hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) erhöhte NT-proBNP-Spiegel aufwiesen. Ein Cut-Off-Wert von 100 pmol/l erreichte eine Sensitivität von 92,4 % und eine Spezifität von 93,9 %. Somit eignet sich die NT-proBNP Bestimmung als Screening-Test für HCM. Katzen, bei denen ein NT-proBNP-Wert > 100 pmol/l festgestellt worden ist, sollten einer Echokardiographie unterzogen werden (WESS et al., 2011b).

2.4.2. BNP in der Veterinärmedizin

Auch die BNP Bestimmung wird in der Tiermedizin verwendet. Allerdings ist BNP aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von 90 Sekunden viel instabiler als NT-proBNP (THOMAS & WOODS, 2003). Im Gegensatz zu NT-proBNP existieren über BNP auch experimentelle Studien bei anderen Tierarten. So konnte gezeigt werden, dass bei Schweinen, die aufgrund einer kongenitalen Herzerkrankung an chronischer Hypoxie litten, die BNP-Konzentration signifikant anstieg (KHAN et al., 2008). In einem Mäusemodell konnte der positive Einfluss von endogenem BNP nachgewiesen werden. Es wurde demonstriert, dass es das Fortschreiten des kardialen Remodellings bei einer DCM verlangsamt (YASUNO et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie an Ratten, die nach einem induzierten Myokardinfarkt eine Woche mit BNP behandelt wurden. Diese Behandlung führte zur Reduktion des Infarktgebietes und des linksventrikulären Remodellings, sowie einer verbesserten linksventrikulären Funktion (GEORGE et al., 2010). Auch Schafe, bei denen ein Myokardinfarkt induziert worden war, zeigten eine signifikant erhöhte BNP

Konzentration verglichen mit der Kontrollgruppe (CAMERON et al., 2000). Ebenso hatten Schafe im Herzversagen bedeutsam höhere BNP Spiegel als gesunde Tiere (PEMBERTON et al., 2002). Eine Korrelation zwischen dem BNP Anstieg und der linksventrikulären Volumenüberladung sowie der Ejektionsfraktion (EF) konnte nachgewiesen werden (RADEMAKER et al., 2000).

Ebenso wie in der Humanmedizin eignet sich die BNP Bestimmung um beim Hund zwischen kardial und nicht kardial bedingter Dyspnoe zu unterscheiden (DEFRANCESCO et al., 2007; PROSEK et al., 2007). Beim Hund korreliert die BNP-Konzentration mit den Klassen des International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC) (HÄUSSLER, 2004; DEFRANCESCO et al., 2007), der Schwere der Herzerkrankung, sowie der Größe des linken Atriums und LA/Ao (MACDONALD et al., 2003). Bezogen auf die Klassen der NYHA konnte gezeigt werden, dass Hunde in den Klassen III und IV signifikant höhere BNP Spiegel aufwiesen als solche in Klasse 0 (ASANO et al., 1999). Bei Hunden mit experimentell induzierter systolischer Dysfunktion ist der BNP Spiegel erhöht (BAUMWART & MEURS, 2005). Des Weiteren ist im okkulten Stadium einer DCM und bei Golden Retrievern mit sekundärer dilatativer Kardiomyopathie aufgrund muskulärer Dystrophie die BNP Konzentration signifikant erhöht (CHETBOUL et al., 2004; OYAMA et al., 2007). Eine weitere Studie demonstrierte, dass für jede Erhöhung des Plasma BNP Spiegels um 10 pg/ml die Mortalitätsrate innerhalb von vier Monaten um 44 % anstieg (MACDONALD et al., 2003). Bei Katzen wurde mittels Immunhistochemie die Verteilung von BNP bei gesunden und an HCM erkrankten Tieren verglichen. Es stellte sich heraus, dass bei gesunden Katzen die Immunreaktivität von BNP auf die Atrien begrenzt war, während bei Vorliegen einer HCM auch eine Immunreaktivität in ventrikulären Myozyten gefunden wurde (BIONDO et al., 2003). Mittels Radioimmunoassay wurde bei Katzen im kongestiven Herzversagen respektive mit systemischer Thrombembolie aufgrund einer felines Kardiomyopathie erhöhte BNP Spiegel detektiert. Ferner war BNP bei asymptomatischen Katzen mit Kardiomyopathie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht (SISSON, 2003). Der Einfluss extrakardialer Ursachen auf die BNP Konzentration wurde nachgewiesen. Hunde bei denen keine kardiale Erkrankung, jedoch traumatische, neurologische, neoplastische oder gastrointestinale Prozesse

nachweisbar waren, zeigten ebenfalls im Einzelfall BNP Spiegel oberhalb des in dieser Studie festgelegten Cut-Off-Wertes für kongestives Herzversagen (LEE et al., 2011).

2.5. NT-proBNP Bestimmung

Zur Bestimmung der natriuretischen Peptide in der Veterinärmedizin kommen mehrere Testmethoden zum Einsatz. Der canine BNP Assay hat sich von einem sehr zeitintensiven C-BNP Radioimmunoassay zu einem C-BNP Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und dem caninen und feline spezifischen NT-proBNP Elisa entwickelt (SISSON, 2004; OYAMA & SINGLETARY, 2010). In dieser Dissertation wurde zum einen der Vetsign® Canine CardioScreen NT-proBNP, Guildhay, Guildford, Surrey, England und zum anderen der Cardiopet® proBNP, IDEXX Laboratories, USA verwendet. Der Einfachheit halber wird ersterer im Folgenden als Vetsign-Test und letzterer als Cardiopet-Test bezeichnet. Ersterer wurde von Boswood et al. validiert (BOSWOOD et al., 2008). Laut Herstellerangaben wurde der Cardiopet-Test ausreichend validiert, die Ergebnisse wurden allerdings nicht veröffentlicht. IDEXX hat Protease-Inhibitor enthaltende Cardiopet-Röhrchen auf den Markt gebracht (COLLINS et al., 2010). Der Protease-Inhibitor soll die Stabilität von NT-proBNP während des Transports gewährleisten. Laut Hersteller kann dadurch der NT-proBNP Abbau über einen Zeitraum von 24 Stunden ohne ein Einfrieren der Probe verhindert werden (IDEXX, 2010b). In einer Studie wurde der Einfluss des Protease-Inhibitors auf NT-proBNP in feline Plasma untersucht. Dazu wurde Blut in EDTA Röhrchen abgenommen, innerhalb von 30 Minuten zentrifugiert und bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde jede Probe in zwei Aliquots separiert. Ein Aliquot wurde in ein Protease-Inhibitor enthaltendes Probenröhrchen gefüllt, das andere wurde so belassen. Jedes Aliquot wurde anschließend in fünf weitere Teilproben geteilt, welche alle bei Raumtemperatur gelagert worden sind. Zum Zeitpunkt 0, nach 24, 48, 96 und 120 Stunden wurde die NT-proBNP-Konzentration gemessen. Während zum Zeitpunkt 0 keine Differenz detektiert werden konnte, zeigte sich, dass der Zusatz des Protease-Inhibitors den NT-proBNP Abbau signifikant reduziert, jedoch nicht vollständig verhindern kann (CONNOLLY et al., 2011b). Eine weitere Studie zum Einsatz von Stabilisatorröhrchen zeigte, dass stabilisiertes feline Plasma, welches bei 4°C 24 Stunden gekühlt wurde, im Vergleich zu nicht stabilisiertem Plasma, welches bis zur Testdurchführung bei -

20°C eingefroren wurde, nur eine geringgradige, nicht signifikant niedrigere NT-proBNP-Konzentration aufweist (GÜNTHER et al., 2010).

2.5.1. Einflussfaktoren auf die NT-proBNP-Konzentration

Die NT-proBNP-Konzentration wird durch diverse Faktoren beeinflusst. Dazu gehören extrakardiale Erkrankungen, Medikamentengabe, wöchentliche Schwankungen sowie das Probenhandling (OYAMA & SINGLETARY, 2010). Zwei veterinärmedizinische Studien haben eine signifikant höhere NT-proBNP-Konzentration für azotämische Hunde verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe demonstriert. In beiden Studien lagen die NT-proBNP-Werte über dem für Hunde im Herzversagen festgelegten Referenzbereich, was bei Verwendung dieser Werte zu falsch-positiven Resultaten geführt hätte (RAFFAN et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009). Dieses kann durch Verwendung eines NT-proBNP/Kreatinin Verhältnisses verhindert werden (SCHMIDT et al., 2009). Auch bei Katzen mit schwerer normotensiver chronischer Niereninsuffizienz ist die NT-proBNP-Konzentration signifikant erhöht (SYME et al., 2006). Bei Patienten mit Nierenerkrankungen ist die angestiegene NT-proBNP-Konzentration nicht nur das Resultat der reduzierten renalen Filtration. Eine diastolische Dysfunktion respektive erhöhtes Plasmavolumen können zu gesteigerter myokardialer Dehnung und daraus resultierender NT-proBNP Freisetzung führen (OYAMA & SINGLETARY, 2010). Systemische und pulmonäre Hypertension führen ebenfalls zu erhöhten NT-proBNP-Spiegeln (ATKINSON et al., 2009; OYAMA et al., 2009). Es konnte kein Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht festgestellt werden (KOLLER & GOEDEL). Weiterhin wird die NT-proBNP-Konzentration durch Tag-zu-Tag Variationen sowie durch wöchentliche Schwankungen beeinflusst (WU, 2006; KELLIHAN et al., 2009). Auch bei gesunden Hunden konnte in Einzelfällen eine NT-proBNP-Konzentration von > 500 pmol/l nachgewiesen werden (KELLIHAN et al., 2009). Diese Fluktuationen können als Resultat von Veränderungen des zirkadianen Rhythmus auftreten. Weiterhin kann die Variabilität des Flüssigkeitshaushaltes aufgrund von Abweichungen bei der Futter- oder Wasseraufnahme, wechselnder körperlicher Aktivität oder veränderter Metabolismus der Peptide für diese Schwankungen verantwortlich sein (WU, 2006; O'HANLON et al., 2007). Durch das Probenhandling und den Versand der Proben kann die NT-proBNP-Konzentration ebenfalls beeinflusst werden. Sowohl bei Serum wie auch bei

Plasma Proben führt eine 24-stündige Lagerung bei Raumtemperatur zu einer 50-prozentigen Reduktion des medianen NT-proBNP-Spiegels (FARACE et al., 2008; COLLINS et al., 2010). Eine humanmedizinische Studie hat gezeigt, dass das Fehlen von standardisierten Abläufen für Probengewinnung, Verarbeitung und Lagerung für 93 % der präanalytischen Variabilität verantwortlich ist (LIPPI et al., 2006).

2.5.2. Cut-Off-Werte für NT-proBNP beim Hund

Abhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung und auch von der jeweiligen Studie werden unterschiedliche Werte angegeben. Die wichtigste Indikation für die NT-proBNP Bestimmung ist die Differenzierung von kardial und extrakardial bedingter Dyspnoe. Dazu wird in einer Studie von OYAMA und Mitarbeitern (2009) ein Cut-Off-Wert von 1158 pmol/l für Hunde im kongestiven Herzversagen angegeben (OYAMA et al., 2009). In einer anderen Studie wurde bei 92 % der Hunde im Herzversagen ein NT-proBNP-Spiegel von > 1400 pmol/l festgestellt (FINE et al., 2008). Für eine kardiale Erkrankung, die noch nicht zum Herzversagen geführt hat, scheint laut BOSWOOD und Mitarbeitern (2008) 210 pmol/l ein geeigneter Cut-Off-Wert zu sein. Allerdings erscheint dieser Cut-Off-Wert im Vergleich zu anderen Studien relativ niedrig. Dieses könnte daraus resultieren, dass einige Proben ungekühlt verschickt worden sind (BOSWOOD et al., 2008). Bei an Mitralklappenendokardiose erkrankten Hunden ist ein NT-proBNP-Spiegel > 450 pmol/l mit einem hochgradigen Erkrankungsstadium assoziiert (CHETBOUL et al., 2009; TARNOW et al., 2009). Beim Screening auf DoCM erscheinen NT-proBNP-Werte > 400 pmol/l verdächtig für das Vorliegen der Erkrankung zu sein (WESS et al., 2011a). In einer weiteren Studie wurde ein Cut-Off-Wert von 445 pmol/l angegeben, um zwischen gesunden und an DCM respektive Mitralklappenendokardiose erkrankten Hunden unterscheiden zu können (OYAMA et al., 2008). Der Verdacht auf eine angeborene Herzerkrankung (PDA, Pulmonalstenose, Atrium-Septum-Defekt) liegt bei einer NT-proBNP-Konzentration > 354 pmol/l vor. Ab einer Konzentration von > 826 pmol/l erscheint dieses wahrscheinlich (SAUNDERS et al., 2009). Vor kurzer Zeit wurden von IDEXX spezielle Cardiopet-Röhrchen entwickelt. Für diesen Test werden eigene Referenzwerte empfohlen. Diese gelten für Patienten mit einem Herzgeräusch und klinischen Symptomen. Bei einem Testergebnis < 800 pmol/l ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Symptome kardial bedingt sind,

gering. Werte zwischen 800 – 1800 pmol/l liegen im Graubereich. In diesem Graubereich ist keine Unterscheidung zwischen einer kardialen und einer extrakardialen Ursache für bestehende Symptome möglich. Bei einer NT-proBNP-Konzentration > 1800 pmol/l ist die Wahrscheinlichkeit, dass die klinischen Symptome kardial bedingt sind, sehr hoch. Eine weitere kardiologische Abklärung des Patienten wird empfohlen (IDEXX, 2010a).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Patienten

Die Patienten sind im Rahmen einer Studie zur DoCM der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München untersucht worden. Es wurden 327 Hunde im Zeitraum von August 2004 bis Januar 2011 untersucht. Die gesamte Studienpopulation setzte sich aus 168 herzgesunden und 159 an der DoCM erkrankten Hunden zusammen. Da bei einigen Patienten, abhängig von ihrem jeweiligen Krankheitsstadium, mehrfach Folgeuntersuchungen durchgeführt worden sind, flossen insgesamt 623 Untersuchungen in die Auswertung ein.

Zur Erstellung der Cut-Off-Werte wurden nur 196 Untersuchungen von 125 gesunden Hunden über fünf Jahre verwendet. Diese Altersgrenze wurde gesetzt, um das Risiko zu minimieren, dass Hunde eingeschlossen wurden, die zu einem späteren Zeitpunkt noch erkranken. Um den Einfluss des Alters auf die NT-proBNP-Konzentration bestimmen zu können, wurden die Hunde in zwei Altersgruppen eingeteilt. Hunde zwischen fünf und acht Jahren wurden in die eine, Hunde über acht Jahren in die andere Altersgruppe eingeteilt.

Es erfolgte eine Einteilung der Hunde in verschiedene Krankheitsstadien. Die Kriterien für die Einteilung werden unter Kapitel 3 Punkt 3.1. – 3.4. erläutert. Die Studienpopulation bestand aus 166 weiblichen und 161 männlichen Tieren. Ihr Gewicht lag zwischen 22,5 kg und 49,2 kg. Die Hunde waren zwischen 0,9 und 16,2 Jahren alt.

2. Einschlusskriterien

In die Studie aufgenommen wurden phänotypisch reinrassige Dobermann Hunde. Es durften keine Hinweise auf das Vorliegen einer anderweitigen kardialen Erkrankung außer der DoCM oder auf systemische Krankheiten bestehen. Als an der DoCM erkrankt galten Hunde, bei denen im 24-Stunden-EKG mehr als 100 VES auftraten und/oder deren echokardiographische Parameter nach den unter Kapitel 3 Punkt 3.3.2. aufgeführten Kriterien verändert waren. Als Graubereich wurde das Auftreten von 50 – 100 VES im 24-Stunden-EKG definiert. Diese Hunde wurden ebenfalls aus der Studie ausgeschlossen, da eine eindeutige

Zuordnung in eine der im Folgenden aufgeführten Gruppen nicht möglich war.

3. Stadieneinteilung

Die Hunde wurden aufgrund der Ergebnisse der Holteruntersuchung sowie der echokardiographischen Untersuchung in die Krankheitsgruppen „herzgesund“, „last normal“ „ „ausschließlich VES““, „ ausschließlich echokardiographische Veränderungen“, „echokardiographische Veränderungen und VES“ sowie „dekompensiert“ eingeteilt.

3.1. Herzgesund

Als herzgesund wurden Hunde klassifiziert, deren Anamnese und klinische Untersuchung komplett unauffällig war. Im Kurzzeit-EKG durften keine pathologischen Veränderungen der Amplituden, keine Abweichung der mittleren elektrischen Herzachse oder Rhythmusstörungen im Sinne von Brady- oder Tachyarrhythmien auftreten. Es sollte ein Sinusrhythmus oder eine respiratorische Sinusarrhythmie vorliegen. Im 24-Stunden-EKG durften maximal 50 VES nachweisbar sein.

Zur Diagnose echokardiographischer Veränderungen wurden die mittels SSSM bestimmten linksventrikulären Volumina beurteilt. Das enddiastolische Volumen (EDV) des linken Ventrikels sollte einen Wert von 100 ml/m² Körperoberfläche nicht übersteigen. Für das endsystolische Volumen (ESV) sollte der Referenzwert von 55 ml/m² Körperoberfläche nicht überschritten werden.

Das LA/Ao Verhältnis gemessen in der rechten parasternalen Kurzachse auf Höhe der Herzbasis durfte nicht größer als 1,5 sein. Bei der Farbdoppler Untersuchung der Herzklappen durften lediglich triviale Klappeninsuffizienzen darstellbar sein. Die Gabe von Medikamenten, die zu einer Beeinflussung des kardiovaskulären Systems führten, war ebenfalls nicht erlaubt.

3.2. Last Normal

„Last normal“ bezeichnet die letzte unauffällige Untersuchung der Hunde vor Erkrankungsbeginn. Die letzte unauffällige Untersuchung der Hunde wurde retrospektiv dieser Gruppe zugeordnet. Das heißt, in dieser Gruppe wurden die Dobermänner eingeteilt, die zu Beginn der Studienteilnahme noch herzgesund waren, bei denen aber im Rahmen einer innerhalb von 18 Monaten

stattgefundenen Folgeuntersuchung die Diagnose DoCM gestellt worden ist. Somit galten für diese Hunde bis zur Diagnosestellung die Kriterien der herzgesunden Gruppe.

3.3. Okkultes Stadium

Bei okkult erkrankten Hunden können Herzrhythmusstörungen isoliert aber auch Echoveränderungen isoliert auftreten. Ebenso ist eine Kombination aus beiden Abnormalitäten möglich. Daher erfolgte eine Differenzierung nach zugrunde liegender Veränderung. Charakteristisch für das okkulte Stadium ist die Abwesenheit klinischer Symptome.

3.3.1. Ausschließlich ventrikuläre Extrasystolen

Traten im 24-Stunden-EKG mehr als 100 VES bei physiologischem Herzultraschall auf, erfolgte eine Zuordnung in diese Gruppe. Weiterhin lagen keine klinischen Anzeichen einer Herzerkrankung vor. Der Bereich zwischen 50 – 100 VES in 24 Stunden wurde als Graubereich definiert. Bei Vorliegen dieses Befundes erfolgte ein Ausschluß, da keine klare Zuordnung zu einer Gruppe möglich war. Traten bei einem echokardiographisch unauffälligen Hund erstmalig zwischen 100 – 300 VES in 24 Stunden auf, erfolgte eine Kontrolle bereits nach 3 Monaten. Wurden im Rahmen dieser Kontrolle mehr als 100 VES diagnostiziert, erfolgte eine Zuordnung zu dieser Gruppe. 50 – 100 VES in dieser Kontrolluntersuchung führten zum Ausschluß.

3.3.2. Ausschließlich echokardiographische Veränderungen

Bei Tieren dieser Gruppe traten die mit einer kompensierten DoCM einhergehenden echokardiographischen Veränderungen auf. Dazu gehörte eine Reduktion der myokardialen Kontraktilität sowie eine Zunahme der endsystolischen und enddiastolischen Volumina über folgende Referenzwerte: $ESV > 55 \text{ ml/m}^2$, $EDV > 100 \text{ ml/m}^2$. Diese wurden mittels SSSM bestimmt. Im M-Mode sollte der LVIDd bei Rüden $< 48 \text{ mm}$ und $< 46 \text{ mm}$ bei Hündinnen sowie der LVIDs $< 36 \text{ mm}$ sein. Während der Durchführung dieser Studie hat sich herausgestellt, dass die Volumenbestimmung mittels SSSM sensitiver zur Diagnose frühzeitiger echokardiographischer Veränderungen im Vergleich zu M-Mode Messungen ist (WESS et al., 2010c). Daher wurden die mittels SSSM bestimmten Volumina als Kriterium für echokardiographische Veränderungen herangezogen. Zusätzlich konnten daraus resultierende Veränderungen wie eine

sekundäre Mitralklappeninsuffizienz oder auch eine Vergrößerung des Verhältnisses von LA/Ao $> 1,5$ vorliegen.

3.3.3. Echokardiographische Veränderungen und ventrikuläre Extrasystolen

Traten mehr als 100 VES in 24 Stunden in Kombination mit oben genannten echokardiographischen Veränderungen auf, erfolgte eine Einteilung in diese Gruppe.

3.4. Dekompensiert

Bei diesen Hunden musste der Verdacht auf eine Dekompensation bestehen. Die Hunde, die bei der Vorstellung Husten zeigten und bei denen röntgenologisch ein Lungenödem diagnostiziert wurde, wurden in diese Gruppe eingeschlossen. Ebenso wurden solche Tiere in diese Gruppe eingeteilt, die Aszites oder andere Anzeichen einer durch eine DoCM bedingten Dekompensation zeigten. Erhielten diese Hunde bereits eine Therapie gegen kongestives Herzversagen, wurden sie auch ohne Auftreten klinischer Symptome dieser Gruppe zugeordnet.

Die Hunde mussten die unter Kapitel 3 Punkt 3.3.2. genannten Echoveränderungen aufweisen. Zusätzlich sollte das LA/Ao-Verhältnis größer als 1,5 sein, sofern noch keine Diuretika Therapie erfolgte. Bei den meisten Hunden traten zusätzlich gravierende Rhythmusstörungen auf, in Einzelfällen waren diese trotz hochgradiger Dekompensation nicht vorhanden.

Zur Therapie durften Diuretika, ACE Hemmer, positiv inotrope Medikamente und Antiarrhythmika eingesetzt werden. Diese durften, je nach Symptomen, einzeln oder in Kombination verabreicht werden.

4. Untersuchungen

Alle Hunde wurden zur Beurteilung ihres Gesundheitszustandes und zum Ausschluß systemischer Krankheiten einer umfassenden Untersuchung unterzogen. Diese beinhaltete die Erhebung einer Anamnese, eine klinische und kardiovaskuläre Untersuchung, ein Kurzzeit-EKG und ein Langzeit-EKG über 24 Stunden, sowie eine echokardiographische Untersuchung.

4.1. Anamnese

Im Rahmen der Anamnese erfolgte eine phänotypische Beurteilung der Hunde

nach dem Standard des Dobermann Vereins um mögliche nicht reinrassige Tiere ausschließen zu können. Teilweise standen dazu auch die Stammbäume und Zuchtpapiere zur Verfügung.

Es wurde das Alter, Geschlecht und Gewicht der Tiere aufgezeichnet. Im Hinblick auf eine mögliche DoCM wurden die Besitzer explizit nach Symptomen wie Leistungsinsuffizienz, Zyanose, Synkopen, Dyspnoe und Husten befragt. Des Weiteren wurden bisherige Krankheiten und Medikamentenapplikation notiert.

4.2. Klinische und kardiovaskuläre Untersuchung

Bei allen Hunden wurden eine komplette klinische Untersuchung und eine kardiovaskuläre Untersuchung durchgeführt. Die kardiovaskuläre Untersuchung beinhaltete eine Herzauskultation mit gleichzeitiger Palpation des Pulses an der *Arteria femoralis*, die Beurteilung der Schleimhäute und der kapillären Füllungszeit sowie die Beurteilung des Jugularvenenpulses.

4.3. Elektrokardiographie

Es wurde ein Kurzzeit-EKG, ein 5-Minuten-EKG und ein 24-Stunden-EKG bei jedem Patienten durchgeführt.

4.3.1. Kurzzeit-Elektrokardiogramm

Zur Aufzeichnung des Kurzzeit-EKGs wurden die Hunde in der rechten Seitenlage gelagert. Es wurden die Ableitungen I, II und III nach Eindhoven, die Ableitungen Augmented Voltage Right Arm (aVR), Left Foot (aVF) und Left Arm (aVL) nach Goldberger und die Brustwandableitung V1 auf Höhe des Herzspitzenstoßes aufgezeichnet. Zur genaueren Beurteilung des Herzrhythmus wurde ein 5-Minuten Ausdruck der Ableitung II angefertigt. Bei dem dafür verwendeten Gerät handelte es sich um ein Cardiovit® der Firma Schiller, Ottobrunn, Deutschland.

4.3.2. Langzeit-Elektrokardiogramm

Jedem Patienten wurde zum weitestgehenden Ausschluss von Herzrhythmusstörungen ein 24-Stunden-EKG angelegt. Dazu wurden auf der rechten Thoraxwand drei und auf der linken Thoraxwand zwei kleine Bereiche vertikal, kurz hinter dem Schulterblatt, zum Ankleben der Elektroden geschoren. Nachdem die geschorenen Stellen mit 70-prozentigem Alkohol entfettet worden sind, wurden die Elektroden auf die Haut geklebt und durch medizinisches Klebeband und elastische Binden fixiert. Das Gerät wurde in einer kleinen Tasche

auf dem Rücken der Hunde in speziell dafür entwickelten Westen befestigt. Die Dobermänner verbrachten die 24 Stunden zu Hause bei ihren Besitzern und sollten der gewohnten Belastung ausgesetzt werden.

Die Offline Analyse erfolgte je nach verwendetem Gerät mit der Software Custo Tera® oder Amedtech®. Da die verwendete Software aus der Humanmedizin stammt, wurden die Untersuchungsergebnisse manuell nachbearbeitet um mögliche Fehlerquellen ausschließen zu können. Zur Verwendung kamen hier die Geräte Custo Flash® 200 und 220 der Firma Arcon Systems, Starnberg, Deutschland, sowie Amedtech ECG pro® der Firma Medizintechnik Aue GmbH, Aue, Deutschland.

4.4. Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung wurde bei allen Probanden unsediert durchgeführt. Die Tiere wurden in rechter und linker Seitenlage auf einem veterinärmedizinischen Kardiologietisch untersucht. Zum Erreichen einer guten Ankopplung wurde 70-prozentiger Alkohol und Ultraschallkontaktgel verwendet.

Es wurde ein 2,0/3,5 Megahertz (MHz) Schallkopf eingesetzt. Um für die nachfolgende Datenanalyse drei Herzzyklen aufzeichnen zu können und mögliche Rhythmusstörungen frühzeitig erkennen zu können, wurde während der gesamten Untersuchung ein einkanaliges EKG aufgezeichnet. Bei allen Patienten wurden die zweidimensionalen Standardaufnahmen, M-Mode, Blutfluss- und Gewebedoppleraufnahmen angefertigt.

Alle echokardiographischen Untersuchungen wurden mit einem Vivid 7 (Firma General Electric Medical Systems, Horten, Norwegen) durchgeführt.

4.4.1. Zweidimensionale Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung wurde mit der Ansicht der rechten parasternalen Längsachse begonnen. In dieser Ebene wurden die Dimensionen der Atrien und Ventrikel, die myokardiale Kontraktilität sowie die Morphologie und Motilität der Atrioventrikularklappen (AV-Klappen) subjektiv beurteilt. Im Anschluß erfolgte die Beurteilung des linksventrikulären Ausflusstraktes und der Aortenklappe. Die rechte parasternale Kurzachse wurde auf Höhe der Papillarmuskeln aufgezeichnet. Anschließend wurde auf Höhe der Herzbasis das LA/Ao-Verhältnis und der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt beurteilt. Ebenso

erfolgte die Beurteilung der Dimensionen, der Kontraktilität und der Klappenmorphologie im linksapikalen Vierkammerblick. Der linksventrikuläre Ausflusstrakt wurde zusätzlich im linksapikalen Fünfkammerblick, der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt noch in einer anderen Aufnahme beurteilt.

4.4.2. M-Mode Echokardiographie

Zur objektiven Beurteilung der Kammerdimensionen wurden M-Mode Aufnahmen in zwei verschiedenen Schnittebenen aufgezeichnet. In der rechten parasternalen Längsachse wurde senkrecht, apikal der maximalen Mitralklappenöffnung, eine Messung durchgeführt. Nach Möglichkeit sollte dafür die Längsachse ohne Papillarmuskel dargestellt werden. Eine weitere Messung wurde in der rechten parasternalen Kurzachse auf Höhe der Papillarmuskeln durchgeführt. Dieses zeigt Abbildung 1. Nach Beendigung der echokardiographischen Untersuchung erfolgte die Auswertung der gespeicherten Bilder. Es wurden folgende Parameter bestimmt: IVSd, IVSs, der enddiastolische linksventrikuläre Durchmesser (KOLLER & GOEDEL), der endsystolische linksventrikuläre Durchmesser (ESD) sowie der Durchmesser der linksventrikulären freien Wand in der Diastole und in der Systole (LVPWd, LVPWs). Die FS wurde automatisch aus dem EDD und dem ESD errechnet.



Abbildung 1: M-Mode Aufnahme des linken Ventrikels in der rechten parasternalen Längsachse und in der Kurzachse.

Während der Durchführung dieser Studie hat sich herausgestellt, dass die Volumenbestimmung mittels SSSM sensitiver zur Diagnose frühzeitiger echokardiographischer Veränderungen im Vergleich zu M-Mode Messungen ist (WESS et al., 2010c). Daher wurden die mittels SSSM bestimmten Volumina als

Kriterium für echokardiographische Veränderungen herangezogen.

4.4.3. Simpson-Scheibchen-Summations-Methode

Die SSSM ist eine Möglichkeit zur Bestimmung der linksventrikulären Volumina und der EF. Dazu wurden Aufnahmen der rechten parasternalen Längsachse und des linksapikalen Vierkammerblickes aufgezeichnet. Wichtig für eine aussagekräftige Volumenbestimmung waren die Darstellung des gesamten Ventrikels inklusive der Herzspitze sowie ein korrekter Anschallwinkel. Es erfolgte eine Offline-Datenanalyse mittels des Software Programmes Echopac® (Firma General Electric Medical Systems, Horten, Norwegen). Diese Messung wurde sowohl am Ende der Systole wie auch am Ende der Diastole durchgeführt. Dazu wurde das Endokard an der Grenze zum Ventrikellumen markiert. Diese Markierung verlief vom septalen zum parietalen Mitralklappensegel entlang der gesamten sichtbaren Endokardgrenze der linken Kammer. Anschließend wurde automatisch eine Verbindungslinie zwischen die beiden Mitralklappenansatzstellen gelegt. Eine weitere, senkrecht zu dieser Gerade, verlaufende Linie bis zur Herzspitze wurde halbautomatisch eingefügt. Durch die Software wurde das markierte Ventrikellumen in kleine Scheibchen geteilt. Anhand der SSSM wurde das endsystolische wie auch das enddiastolische Volumen des linken Ventrikels bestimmt. Des Weiteren erfolgte eine Berechnung der EF. Abbildung 2 zeigt die Volumenbestimmung mittels der SSSM.

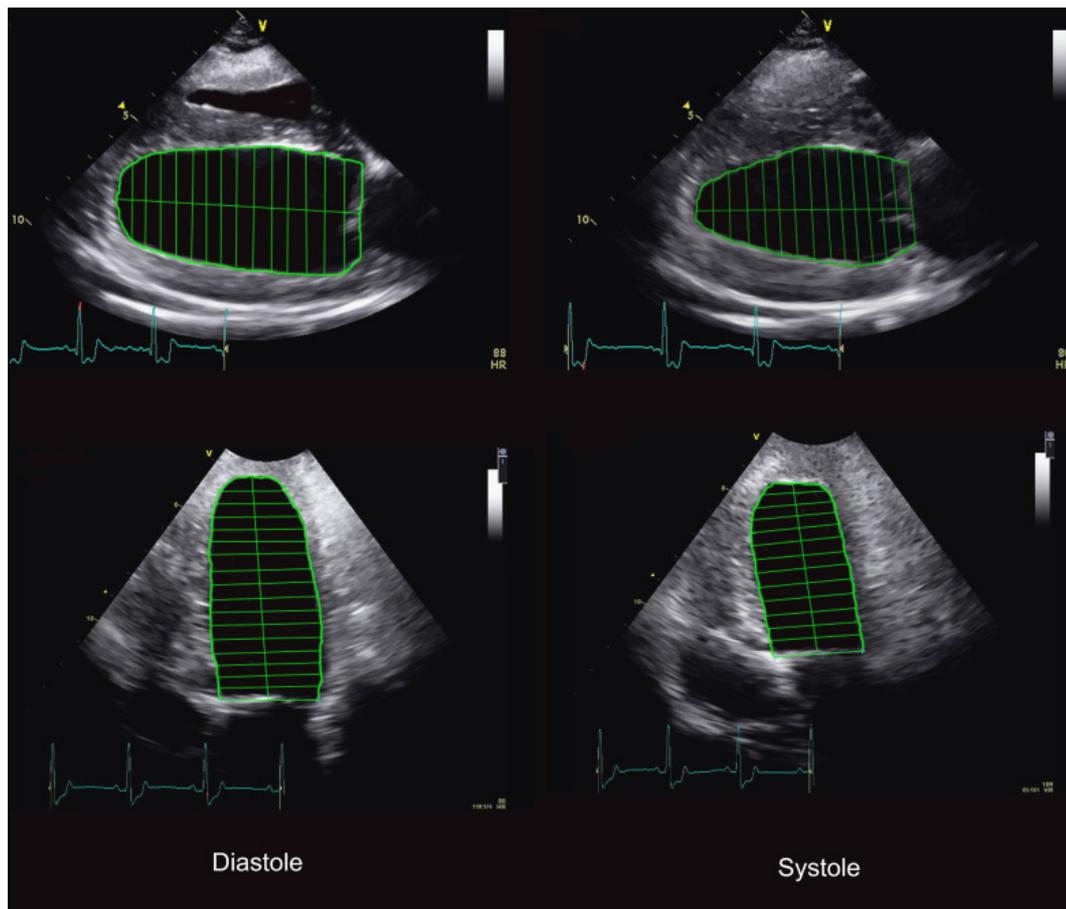


Abbildung 2: Sonographische Darstellung des linken Ventrikels in der rechten parasternalen Längsachse (oben) sowie im linksapikalen Vierkammerblick (unten). Die Endokardgrenze sowie die von der Auswertungssoftware erstellten Scheibchen sind grün dargestellt (WESS et al., 2010c).

4.4.4. Blutflussdoppler-Echokardiographie

Zum Ausschluss von Klappeninsuffizienzen, Klappenstenosen oder Shunts wurden die AV- und Semilunarklappen, das atriale und das interventrikuläre Septum, sowie der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt zum Ausschluss eines PDA mit dem Farbdoppler untersucht. Die Messung der Blutflussgeschwindigkeit in der Pulmonalarterie erfolgte in der rechten parasternalen Kurzachse auf Höhe der Herzbasis mit dem Pulsed-Wave- und dem Continuous-Wave-Doppler (PW-/CW-Doppler). Die Messung der AV-Klappen Einflussprofile wurde im linksapikalen Vierkammerblick mittels PW- und CW-Doppler durchgeführt. Im linksapikalen Fünfkammerblick wurde der Aortenfluss mittels CW-Doppler bestimmt.

5. NT-proBNP Messung

Zur Bestimmung der NT-proBNP-Konzentration kamen in dieser Studie zwei

verschiedene NT-proBNP-Testkits zum Einsatz. Es wurde der Vetsign® Canine CardioSCREEN NT-proBNP der Firma Guildhay Limited, Guildhay, Guildford, Surrey, England und der Cardiopet® proBNP Test, IDEXX Laboratories, USA, verwendet.

5.1. Blutabnahme und Blutprobenverarbeitung

Die Blutabnahme erfolgte an der *Vena jugularis*. Das Blut wurde in ein zuvor bei -20°C tiefgefrorenes Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Röhrchen gefüllt, welches zur Vermeidung einer Unterbrechung der Kühlkette auf einem Kühllakku transportiert wurde. Anschließend wurde die Blutprobe bei 4°C und 1600 Umdrehungen für zehn Minuten abzentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde in ein Polyesterlörhrchen pipettiert und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

5.2. Testprinzip

Im klinikeigenen Labor kam der Vetsign® Canine CardioSCREEN NT-proBNP-Test zum Einsatz. Dabei handelt es sich um einen ELISA, welcher immunreaktives NT-proBNP in caninem Serum oder Plasma misst. Um eine hohe Spezifität zu erreichen enthält der Test gereinigte, immunoaffine Antikörper, die aus Schafsblut gewonnen wurden. Diese sind spezifisch für canines NT-proBNP. Die Wells der Mikrotiterplatte sind mit dem Capture-Antikörper anti-NT-proBNP (25-41) beschichtet. Der Tracer enthält den zur Detektion benötigten anti-NT-proBNP Antikörper (1-22), welcher mit Meerretich Peroxidase konjugiert ist. Im Inkubationsschritt wird die Probe gleichzeitig zusammen mit dem Tracer, welcher den zur Detektion benötigten Antikörper enthält, in die Wells gegeben. In der Probe vorhandenes NT-proBNP bindet an die Capture-Antikörper, welche in der Beschichtung der Wells vorhanden sind und formt so zusammen mit dem Detektions-Antikörper einen Sandwich-Komplex. Zur Entfernung von ungebundenem Material wird die Platte gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidin. Gebundenes NT-proBNP wird durch einen Enzym katalysierten Farbumschlag, welcher in einem Mikrotiterplattenleser nachweisbar ist, quantifiziert. Die Intensität der vorhandenen Farbe ist direkt proportional zu der NT-proBNP Immunoreaktivität der Probe oder der Standardlösung. Anschließend wird anhand der Konzentration der Standards eine Standardkurve erstellt. Mittels dieser Standardkurve wird die NT-proBNP-Konzentration der Proben berechnet. Der Test wurde vom Hersteller evaluiert,

dazu liegen folgende Angaben vor: 210 pmol/l dient als Cut-Off-Wert zur Unterscheidung gesunder Hunde und Hunden mit respiratorisch bedingter Dyspnoe gegenüber Hunden mit kardial bedingter Dyspnoe. Dieser Wert hat eine Sensitivität von 85 % und eine Spezifität von 90 %. Die minimal detektierbare NT-proBNP-Konzentration liegt bei 42 pmol/l. Für die Intra-Assay-Präzision wurden folgende Werte angegeben: für niedrige Konzentrationen 6,4 %, für mittlere Konzentrationen 8,4 % und für hohe Konzentrationen 7,1 %. Folgende Werte gelten für die Inter-Assay-Präzision: 7,1 % für eine niedrige, 8,6 % für eine mittlere und 8,2 % für eine hohe Konzentration.

Der bei IDEXX verwendete Cardiopet® proBNP Test beruht auf dem gleichen Testprinzip.

5.3. Testdurchführung

Der Vetsign-Test wurde laut Herstellerangaben im klinikeigenen Labor durchgeführt. Vorbereitend wurde die Waschlösung durch Zugabe von 950 ml destilliertem Wasser zu 50 ml Konzentrat hergestellt. Anschließend wurden alle gefrorenen Proben und Standardlösungen 30 Minuten im Wasserbad auf Raumtemperatur (18-26°C) erwärmt. Bevor von jeder Probe, jedem Standard und dem Leerwert 20 µl im Doppelansatz in die Wells pipettiert wurden, wurden diese mit einem Rüttelgerät REAX 2000®, Firma Heidolph, Deutschland gründlich durchmischt. Tabelle 2 stellt einen Plattenbelegungsplan dar. Anschließend wurde 200 µl Tracer in alle Wells hinzugefügt. Die Durchmischung der ganzen Platte erfolgte auf einem Rüttelgerät TPM 2® der Firma Sarstedt, Deutschland. Die Platte wurde mit einer Folie bedeckt und 20 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten fünfmal mit jeweils 350 µl Waschlösung gewaschen. Verbleibende Waschlösung sollte nach dem letzten Waschvorgang durch das Ausschlagen der Platte auf einem Papiertuch entfernt werden. Im Anschluß daran wurde 200 µl Substrat in die Wells pipettiert und es erfolgte wieder eine Durchmischung mit oben genanntem Rüttelgerät. Die Platte wurde wieder mit Folie bedeckt und 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jeweils 50 µl Stop-Lösung in jedes Well pipettiert und die Platte wurde mittels oben genanntem Rüttelgerät durchmischt. Dann wurde die Platte sofort in einen Mikrotiterplattenleser Synergy HT® der Firma Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland, geschoben. Bei 450 nm wurden die optischen

Dichten bestimmt. Mittels der zugehörigen Software Gen 5 erfolgte die Berechnung der Konzentration und Überführung der Daten in eine Excel Datei.

Tabelle 2: Darstellung der ELISA Plattenbelegung (STD = Standardlösung, SPL = Probe, BLK = Leerwert)

STD1	STD1	SPL4	SPL4	SPL12	SPL12	SPL20	SPL20	SPL28	SPL28	SPL36	SPL36
STD2	STD2	SPL5	SPL5	SPL13	SPL13	SPL21	SPL21	SPL29	SPL29	SPL37	SPL37
STD3	STD3	SPL6	SPL6	SPL14	SPL14	SPL22	SPL22	SPL30	SPL30	SPL38	SPL38
STD4	STD4	SPL7	SPL7	SPL15	SPL15	SPL23	SPL23	SPL31	SPL31	SPL39	SPL39
STD5	STD5	SPL8	SPL8	SPL16	SPL16	SPL24	SPL24	SPL32	SPL32	SPL40	SPL40
SPL1	SPL1	SPL9	SPL9	SPL17	SPL17	SPL25	SPL25	SPL33	SPL33	SPL41	SPL41
SPL2	SPL2	SPL10	SPL10	SPL18	SPL18	SPL26	SPL26	SPL34	SPL34	SPL42	SPL42
SPL3	SPL3	SPL11	SPL11	SPL19	SPL19	SPL27	SPL27	SPL35	SPL35	BLK	BLK

5.4. Berechnung der NT-proBNP-Konzentration

Anhand der optischen Dichte wurde die NT-proBNP-Konzentration berechnet. Dieses erfolgte nach der vom Hersteller empfohlenen Formel:

Formel 1: 4-Parameter-log Formel zur Berechnung der NTpro-BNP Konzentrationen aus den optischen Dichten.

$$y = (a-d)/(1+(x/c)^b) + d$$

Die Variablen x und y geben die optische Dichte respektive die NT-proBNP-Konzentration an. Die Parameter a, b, c und d wurden anhand der für die Standardkonzentrationen gemessenen optischen Dichten berechnet. Dieses erfolgte durch Anwendung eines Parameterschätzverfahrens nach dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate. Die Schätzung der optimalen Parameter wurde mit dem Verfahren von Levenberg und Marquardt in der Implementierung des Numerik-Softwarepaketes SCILAB, Version 4.1.2 durchgeführt. Pro Hund wurden zwei optische Dichten ermittelt, aus welchen dann die NT-proBNP-Konzentration berechnet wurde. Aus den so entstandenen NT-proBNP-Werten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung beider Werte berechnet. War die Standardabweichung zwischen beiden Werten größer als 15 % erfolgte ein Ausschluß dieses Wertes und die Probe wurde erneut gemessen.

5.5. Studienablauf

Um die verschiedenen Fragestellungen dieser Dissertation zu klären, wurde folgender Studienablauf durchgeführt.

5.5.1. Vorversuch

Ein Ziel dieser Studie war der Vergleich von zwei verschiedenen Testkits. Die Ergebnisse des Vetsign-Tests sollten mit denen des Cardiopet-Tests verglichen werden. Für den Cardiopet-Test lagen Protease-Inhibitor enthaltende Probenröhrchen vor, die den Abbau des NT-proBNPs ungekühlt für einen Zeitraum von 24 Stunden verhindern sollen. Für den Hauptversuch lag bereits bei -80°C tiefgefrorenes EDTA-Plasma vor. Dieser Vorversuch sollte die Frage klären, ob die für den Hauptversuch eingefrorenen Proben zur Erreichung der optimalen Stabilität vor der Messung in ein Stabilisatorröhrchen gefüllt werden sollten. Eine Probe wurde in mehrere Anteile geteilt und es erfolgte eine NT-proBNP Messung unter Verwendung des Vetsign-Tests im klinikeigenen Labor, sowie unter Verwendung des Cardiopet-Tests bei IDEXX in Ludwigsburg. Dazu wurde die Blutabnahme und die Verarbeitung des Blutes wie bereits beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurden 17 Blutproben von Dobermännern unterschiedlicher Krankheitsstadien verwendet. Jede EDTA-Plasma Probe wurde in drei Aliquote geteilt. Ein Anteil EDTA-Plasma wurde nach Anleitung in ein Cardiopet-Röhrchen gefüllt und bei Kühlschranktemperatur bis zur Abholung durch den Laborfahrdienst am selben Tag aufbewahrt. Die NT-proBNP-Konzentration dieser Probe wurde im Rahmen der nächsten bei IDEXX stattfindenden NT-proBNP-Testdurchführung bestimmt. Die anderen beiden Aliquote wurden sofort nach dem Zentrifugieren bei -80°C tiefgefroren. Nach Abschluss des Vorversuchs erfolgte eine Sammelversendung dieser Proben auf Trockeneis zu IDEXX. Nach dem Auftauen der Proben wurde ein Aliquot in ein Cardiopet-Röhrchen gefüllt, aus welchem die Bestimmung der NT-proBNP-Konzentration erfolgte. Die Bestimmung der NT-proBNP-Konzentration der verbleibenden Probe erfolgte direkt aus dem Polyesterlöröhrchen.

5.5.2. NT-proBNP-Stabilität unter Verwendung des Cardiopet-Röhrchens

Da während des Vorversuches sehr hohe Umgebungstemperaturen herrschten, die beim Transport einen möglichen Einfluss auf die Stabilität des NT-proBNPs im Cardiopet-Röhrchen hätten haben können, wurde die Stabilität unter gleich bleibenden Bedingungen erneut überprüft. Somit sollte die Frage geklärt werden, ob ein ungekühlter Versand der Probe in dem Stabilisatorröhrchen unter Praxisbedingungen möglich ist. Dazu wurden Blutproben von 28 Hunden verschiedener Rassen verwendet.

Zur Überprüfung der NT-proBNP-Stabilität im Cardiopet-Röhrchen erfolgte die Aufteilung einer Probe in zwei Aliquote. Blutabnahme und Verarbeitung wurden, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Da laut Anleitung kein Einfrieren notwendig ist und ein maximal 24 Stunden dauernder Transport möglich ist, wurde das Cardiopet-Röhrchen zur Simulation realistischer Bedingungen 16 – 18 Stunden bei Raumtemperatur (ca 20°C) verwahrt und erst anschließend bei -80°C eingefroren. Der andere Probenanteil wurde sofort eingefroren. Nach dem vollständigen Vorliegen aller Proben erfolgte eine Versendung auf Trockeneis zu IDEXX, wo die NT-proBNP Bestimmung in einem Testansatz mittels Cardiopet-Test durchgeführt wurde.

5.5.3. Testvergleich

Im klinikeigenen Labor erfolgte die Messung der NT-proBNP-Konzentration aus bei -80°C gelagertem EDTA-Plasma wie unter Kapitel 5 Punkt 5.3. beschrieben. Dazu wurde der Vetsign-Test verwendet. Des Weiteren erfolgte eine Versendung auf Trockeneis der Aliquote zu IDEXX. Dort erfolgte eine NT-proBNP Messung der aufgetauten Probe direkt aus dem Polyesterlörhrchen unter Verwendung des Cardiopet-Test.

5.5.4. Follow-Up-Studie

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Durchführung einer Follow-Up-Studie. In einer vorherigen Studie zum Thema NT-proBNP beim Dobermann waren Hunde aufgefallen, die gesund waren, aber eine NT-proBNP-Konzentration > 400 pmol/l aufwiesen. Da dieser Wert als Cut-Off-Wert zur Differenzierung von gesunden und kranken Hunden relativ gut geeignet ist, sollte durch eine Follow-Up Untersuchung eruiert werden, ob diese Hunde erkranken. Damit sollte überprüft werden, ob der NT-proBNP-Wert in dieser Untersuchung korrekt erhöht war und somit sensitiver war als der derzeitige diagnostische Goldstandard bestehend aus Holter und Echokardiographie oder ob extrakardiale Ursachen für eine Erhöhung verantwortlich sind. Um eine Aussage darüber treffen zu können, mussten mindestens zwölf Monate bis zur Follow-Up Untersuchung vergangen sein.

Ebenso wurden Hunde, bei denen in der vorherigen Studie Veränderungen festgestellt wurden (das heißt, Zugehörigkeit zu den Erkrankungsstadien „ausschließlich VES“, „ausschließlich Echoveränderungen“, „Echoveränderungen und VES“) und deren NT-proBNP-Konzentration < 400 pmol/l lag, erneut

untersucht, um den weiteren Verlauf der NT-proBNP-Konzentration darzustellen.

6. Statistische Auswertung

Der Großteil der statistischen Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS® (Statistical Package for the Social Science) 18.0 für Windows. Die Receiver Operating Characteristic Kurven (ROC Kurven) und die Dot-Diagramme entstanden unter Verwendung des Programms MedCalc® Statistical Software. Mittels deskriptiver und explorativer Statistik wurden die physiologischen Parameter untersucht. Die Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ definiert.

6.1. Einflussfaktoren

Der Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht auf die NT-proBNP-Konzentration wurde anhand der herzgesunden Kontrollgruppe überprüft. Dazu wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

6.2. Testvergleich

Der Vergleich der NT-proBNP-Werte im Rahmen des Vorversuchs, des Hauptversuchs und der Überprüfung der Stabilität erfolgte mittels Bland-Altman Diagramm und gepaartem T-Test.

6.3. Referenzwert

Der Referenzwert wurde anhand der NT-proBNP-Werte der herzgesunden Kontrollgruppe erstellt. Es wurde der Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Diese Berechnung erfolgte mittels deskriptiver Statistik.

6.4. Vergleich der Krankheitsstadien

Der Vergleich der einzelnen Krankheitsstadien erfolgte mittels der Analysis Of Variance Between Groups (ANOVA-Analyse). Bei Vorliegen einer Varianz wurde anschließend der Mehrfachvergleich nach Tamhane verwendet. Damit konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen dargestellt werden.

6.5. Erstellung der Cut-Off-Werte

Die Berechnung der Cut-Off-Werte wurde mit Hilfe des MedCalc® Statistikprogrammes durchgeführt. Dazu wurden ROC-Kurven erstellt und die

Flächen unter den Kurven (area under the curve = AUC) berechnet. Sensitivität und Spezifität für verschiedene Cut-Off-Werte wurde ebenfalls berechnet.

IV. ERGEBNISSE

1. Charakterisierung der Gesamtpopulation

Im Rahmen dieser Studie wurden NT-proBNP-Werte von gesunden und „last normal“ Hunden, sowie der Krankheitsstadien „ausschließlich VES“, „ausschließlich Echoveränderungen“, „Echoveränderungen und VES“ und „dekompensiert“ verwendet. Die Zuordnung zur jeweiligen Erkrankungsgruppe erfolgte nach den unter Kapitel 3 Punkt 3 angegebenen Kriterien. Die gesamte Studienpopulation wurde im Hinblick auf Alters-, Geschlechts- und Gewichtsverteilung untersucht. In Tabelle 3 wird die Verteilung dieser Parameter dargestellt.

Tabelle 3: Darstellung der Verteilung von Alter (in Jahren), Gewicht (in Kilogramm) und Geschlecht bezogen auf alle Untersuchungen in den einzelnen Stadien. (Mean = Mittelwert, Min = Minimum, Max = Maximum, VES = Ventrikuläre Extrasystolen).

		gesund	noch normal	nur VES	nur Echo	VES + Echo	dekompensiert
Anzahl der Hunde		168	27	55	29	53	22
Anzahl Untersuchungen		295	27	128	51	114	35
Alter	mean	6,2	6,0	8,3	6,1	8,0	7,3
	median	6,1	6,1	8,4	6,0	8,2	7,6
	min	0,9	2,0	1,7	2,4	2,7	3,6
	max	12,5	10,4	12,7	11,7	16,2	11,3
Gewicht	mean	34,8	37,7	35,0	35,6	37,3	35,8
	median	35,0	39,0	34,3	36,0	37,0	37,0
	min	22,5	25,0	23,6	25,0	24,4	24,5
	max	48,0	48,0	48,0	45,0	49,2	47,4
Geschlecht	weiblich	98	11	34	11	16	7
	männlich	70	16	21	18	37	15

Je nach Fragestellung wurde teilweise nur ein bestimmter Anteil der Gesamtpopulation oder der Untersuchungen einbezogen. Dieses wird unter dem jeweiligen Unterpunkt erläutert.

Beim Alter lag eine Normalverteilung in allen Stadien vor. Im Vergleich zu den gesunden Tieren waren nur die Hunde mit „ausschließlich VES“ und der Kombination aus VES und Echoveränderungen signifikant älter. Ansonsten lag zwischen den gesunden Hunden im Vergleich mit Hunden der Gruppen „ausschließlich Echoveränderungen“, „dekompensiert“ und „last normal“ kein Unterschied vor. Außerdem ist das Alter der Hunde in den Gruppen „ausschließlich VES“ und „Echoveränderungen und VES“ signifikant höher als das Alter in den Gruppen „ausschließlich Echoveränderungen“ und „last normal“. Zwischen den Gruppen „ausschließlich VES“ und „Echoveränderungen und VES“ bestand kein Altersunterschied. Ebenso lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Hunden der „dekompensierten“ Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen vor.

Das Gewicht war in allen Stadien homogen verteilt, es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen vor.

Die Geschlechtsverteilung stellte sich in den einzelnen Gruppen der Gesamtpopulation inhomogen dar. Von den 168 gesunden Hunden sind 58,3 % weiblich und 41,7 % männlich. 61,8 % der Tiere, bei denen „ausschließlich VES“ auftraten waren weiblich, 38,2 % männlich. In der Gruppe der Hunde, die „ausschließlich Echoveränderungen“ zeigten waren 37,9 % Hündinnen und 62,1 % Rüden und bei Kombination beider Veränderungen lag der Anteil der Hündinnen bei 30,2 % und der Anteil der Rüden bei 69,8 %. In der „dekompensierten“ Gruppe waren 31,8 % weiblich und 68,2 % männlich. In der „last normal“ Gruppe waren 40,7 % weibliche und 59,3 % männliche Hunde vertreten.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Holteruntersuchung und über einige echokardiographische Parameter in den einzelnen Stadien.

Tabelle 4: Darstellung der VES, des enddiastolischen und endsystolischen linksventrikulären Volumens gemessen in der rechten parasternalen Längsachse, der Ejektionsfraktion, dem enddiastolischen und endsystolischen Durchmesser gemessen in der rechten parasternalen Längsachse, der Verkürzungsfraktion und dem Verhältnis vom linkem Atrium zur Aorta für alle Untersuchungen der gesamten Studienpopulation. Angabe EDV/ESV in ml, EDD/ESD in cm, FS und EF in Prozent (VES = Ventrikuläre Extrasystolen, Mean = Mittelwert, EDV = Enddiastolisches Volumen, ESV = Endsystolisches Volumen re.para. = rechts parasternal, EF = Ejektionsfraktion, EDD = Enddiastolischer Durchmesser, ESD = Endsystolischer Durchmesser, FS = Verkürzungsfraktion, LA/Ao = Verhältnis vom linken Atrium zur Aorta, Min. = Minimum, Max. = Maximum, SSSM = Simpson-Scheibchen-Summationsmethode, M-Mode = Motion Mode, ml = Milliliter cm = Zentimeter).

	gesund	last normal	nur VES	nur Echo	Echo u. VES	dekompensiert
VES Holter						
Mean	7	9	3855	18	4047	3638
Median	3	5	675	10	827	308
Min.-Max.	0-50	0-31	50- 100000	0-50	63-68264	4-31741
SSSM						
EDV re. para.						
Mean	75,3	75,9	79,1	112,2	115,7	157,9
Median	76,0	76,1	80,7	106,4	109,8	137,9
Min.-Max.	27,5-98,5	50,37-98,0	48,7-97,5	89,0- 201,4	81,8-196,1	101,4-267,5
ESV re. para.						
Mean	38,2	41,6	41,4	69,7	73,4	111,2
Median	38,2	40,7	41,7	68,4	66,8	98,1
Min.-Max.	20,6-54,8	21,7-54,9	22,5-54,8	55,1-160	54,2-149,9	54,0-212,3
EF biplan						
Mean	47,8	45,4	47,2	38,6	37,9	31,7
Median	47,5	45,9	47,0	38,7	37,3	34,5
Min.-Max.	28,2-41,5	33,4-57,2	31,3-63,1	26,6-52,4	12,0-134,9	10,0-48,3
M-Mode						
EDD längs						
Mean	4,0	4,1	4,2	4,9	5,0	5,8
Median	4,0	4,2	4,2	4,9	5,0	5,6
Min.-Max.	2,9-4,8	3,0-4,8	3,1-4,8	4,6-6,5	4,6-6,5	4,6-7,5
ESD längs						
Mean	2,9	3,1	3,1	3,9	4,1	5,0
Median	2,9	3,0	3,0	3,9	4,0	4,7
Min.-Max.	1,1-3,6	2,2-3,6	2,2-3,6	3,6-5,9	3,7-5,7	3,7-7,5
FS						
Mean	27,5	26,2	25,2	20,6	19,7	16,1
Median	27,3	25,9	25,1	20,6	19,3	15,5
Min.-Max.	15,5-42,3	13,0-33,7	13,0-40,2	9,0-33,2	8,0-36,5	4,0-28,2
LA/AO						
Mean	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	2,1
Median	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	2,0
Min.-Max.	0,85-1,5	1,0-1,5	0,95-1,7	0,89-3,06	0,92-2,7	1,5-3,5

2. NT-proBNP

2.1. Einflussfaktoren

Der Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht auf die NT-proBNP-Konzentration wurde für die gesunde Kontrollgruppe bestimmt. Diese bestand aus 125 gesunden Hunden, die über fünf Jahre alt sein mussten (Mittelwert Alter: 7,9 Jahre, Mittelwert Gewicht: 35,5 kg). Diese Altersgrenze wurde gewählt, um das Risiko zu minimieren, dass Hunde eingeschlossen wurden, die die Erkrankung mit zunehmendem Alter entwickeln. 73 Tiere waren weiblich und 52 waren männlich. NT-proBNP wurde in 196 verschiedenen Untersuchungen in dieser Gruppe bestimmt. Lediglich das Alter hatte einen signifikanten Einfluss auf die NT-proBNP-Konzentration. Gewicht und Geschlecht hingegen beeinflussten die NT-proBNP-Konzentration nicht. Zwischen den NT-proBNP-Werten der beiden Altersgruppen bestand ein signifikanter Unterschied, wobei die älteren Tiere höhere NT-proBNP-Konzentrationen aufwiesen. Diese lag bei den Hunden > 8 Jahre bei 516 pmol/l, in der Altersgruppe 5 – 8 Jahre betrug die Konzentration 381 pmol/l. Dieses wird in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: NT-proBNP-Konzentration in pmol/l in den beiden verschiedenen Altersgruppen der gesunden Kontrollgruppe. (N = Anzahl der Untersuchungen, Std. = Standardabweichung).

Alter in Jahren	Mittelwert	N	Std.	Minimum	Maximum
5 – 8	381	114	298	2	1442
> 8	516	82	335	32	1411
Insgesamt	437	196	320	2	1442

2.2. Vorversuch

Für den Vorversuch wurden Proben von Hunden unterschiedlicher Krankheitsstadien verwendet. Da bei Überschreiten der maximal durch den Cardiopet-Test messbaren NT-proBNP-Konzentration diese als > 3030 pmol/l angegeben wurde, sind diese Werte als 3030 pmol/l in die Berechnung eingeflossen. Diese Untersuchung ergab einen NT-proBNP Mittelwert von 831 pmol/l für das nach Testanleitung verwendete Cardiopet-Stabilisatorröhrchen, 1330 pmol/l für das direkt aus dem Polyesterolröhrchen gemessene EDTA-Plasma,

also für die Probe ohne Stabilisator. Als Resultat für das EDTA-Plasma, welches nach dem Auftauen, also vor der Durchführung der Messung, in ein Cardiopet-Stabilisatorröhrchen umgefüllt worden ist, ergab sich ein NT-proBNP-Wert von 1307 pmol/l. Der Mittelwert der NT-proBNP-Konzentration des Cardiopet-Röhrchens ist somit um 37,5 % respektive 36,4 % niedriger als der des EDTA-Plasmas aus dem Polysterolröhrchen respektive der des umgefüllten EDTA-Plasmas. In Tabelle 6 ist der Mittelwert, der Median, sowie Minimum und Maximum der drei verschiedenen Probentypen dargestellt. Das Cardiopet-Röhrchen wird als „mit Stabilisator“, das vor der Messung vom Polysterolröhrchen ins Cardiopet-Röhrchen umgefüllte Plasma als „Stabilisator vor der Messung“ und das direkt aus dem Polysterolröhrchen gemessene Plasma als „kein Stabilisator“ bezeichnet. Tabelle 22 im Anhang zeigt die NT-proBNP Ergebnisse der einzelnen Hunde für das jeweilige Probenröhrchen.

Tabelle 6: NT-proBNP-Konzentration in pmol/l für die verschiedenen Probentypen. Angegeben ist der Mittelwert, der Median sowie Minimum (= Min.) und Maximum (= Max.).

Probentyp	Mit Stabilisator	Stabilisator vor der Messung	Kein Stabilisator
Mittelwert	831	1307	1330
Median	487	628	628
Min.-Max.	59 - 2244	77 - 3030	102 - 3030

Es zeigte sich eine statistisch signifikant niedrigere NT-proBNP-Konzentration des Cardiopet-Röhrchens im Vergleich zu dem EDTA-Plasma, welches in ein Cardiopet-Röhrchen umgefüllt worden ist. Ebenso wurde in der direkt aus dem Polysterolröhrchen gemessenen Probe eine signifikant höhere NT-proBNP-Konzentration im Vergleich zum Cardiopet-Röhrchen gemessen. Zwischen der ins Cardiopet-Röhrchen umgefüllten und der direkt aus dem Polysterolröhrchen gemessenen Probe bestand nur ein geringer Konzentrationsunterschied, welcher nicht signifikant war.

2.3. Stabilität des NT-proBNPs im Cardiopet-Stabilisatorröhrchen

Zur Überprüfung der Stabilität wurden die Blutproben von 28 Hunden verwendet. Die Werte der einzelnen Hunde sind in Tabelle 23 im Anhang dargestellt. Da bei Überschreiten der maximal durch den Cardiopet-Test messbaren NT-proBNP-Konzentration diese als > 3030 pmol/l angegeben wurde, sind diese Werte als 3030 pmol/l in die Berechnung eingeflossen.

Diese Untersuchung ergab einen NT-proBNP Mittelwert von 857 pmol/l für das direkt eingefrorene EDTA-Plasma und einen um 38,1 % niedrigeren Mittelwert in Höhe von 531 pmol/l für das nach Testanleitung verwendete Cardiopet-Stabilisatorröhrchen. Das bedeutet, dass das Stabilisatorröhrchen zur Simulation realistischer Transportbedingungen 16 – 18 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und erst anschließend eingefroren wurde. Die NT-proBNP-Konzentration im Cardiopet Stabilisatorröhrchen ist signifikant niedriger als die Konzentration im sofort eingefrorenen EDTA-Plasma ohne Stabilisatorzusatz. Die Korrelation beider Werte ist hoch. Dieses ist in Tabelle 7 und Abbildung 3 dargestellt. Somit kann der dem Cardiopet-Röhrchen zugesetzte Protease-Inhibitor den NT-proBNP Abbau nicht verhindern. Der Versand der gefrorenen Probe ohne Stabilisator zeigt deutlich höhere NT-proBNP-Werte.

Tabelle 7: NT-proBNP Mean (= Mittelwert) in pmol/l für das Cardiopet Stabilisatorröhrchen und das eingefrorene Plasma, sowie Korrelation, Signifikanz und Probenanzahl (= N).

Probe	Mean	Korrelation	Signifikanz	N
Kein Stabilisator	857	0,965	0,000	28
Mit Stabilisator	531			

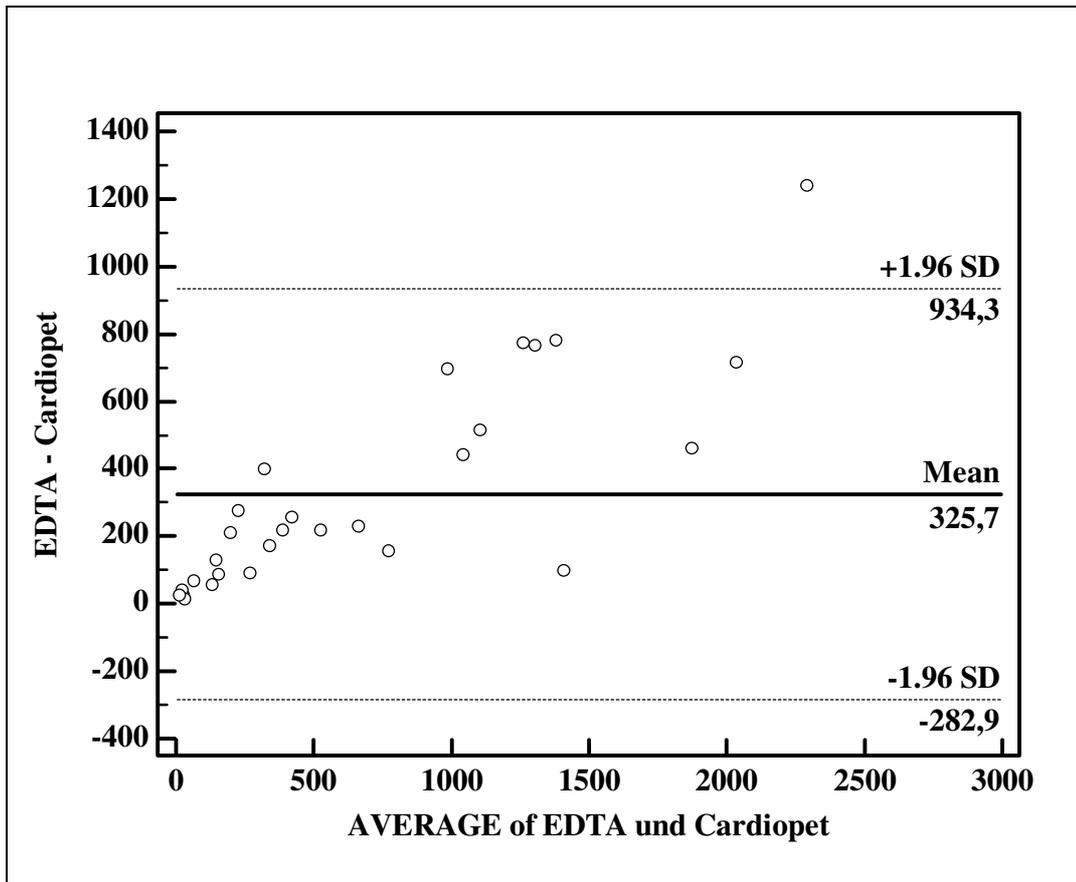


Abbildung 3: Bland-Altman Plot der NT-proBNP-Konzentration in pmol/l des sofort gefrorenen EDTA-Plasmas sowie des Cardiopet Stabilisatorröhrchens von 28 Hunden. Auf der x-Achse wird die Differenz der Testergebnisse gegenüber dem Mittelwert beider Methoden auf der y-Achse dargestellt. Die Differenz des Mittelwertes ist als durchgehende Linie, die Limits of Agreement ($\pm 1,96$ SD = Standardabweichung) sind als gestrichelte Linien dargestellt.

2.4. Testvergleich

Für den Vergleich der Ergebnisse des Vetsign und des Cardiopet-Tests wurden 557 Untersuchungen, für welche NT-proBNP Ergebnisse für beide Tests vorlagen, aus der Gesamtpopulation herangezogen. Da die Ergebnisse des Vorversuchs gezeigt haben, dass der Zusatz eines Stabilisators keinen Einfluss auf die NT-proBNP-Konzentration hat, wurden die bei -80°C eingefrorenen Proben ohne Stabilisatorzusatz gemessen. In diesem Fall sollte lediglich eine Aussage über die Messwerte getroffen werden, daher wurden Proben von gesunden Hunden ohne bestimmtes Mindestalter verwendet. Werte, die über dem maximalen Messbereich der Testkits lagen und als > 3030 pmol/l angegeben wurden, flossen als 3030 pmol/l in die Berechnung ein. Findet ein Vergleich der Ergebnisse im gesamten Messbereich der Tests statt, erzielt der Cardiopet-Test

signifikant höhere Messergebnisse als der Vetsign-Test. Es liegt in diesem Fall ein relativ hoher Korrelationskoeffizient vor. Es erfolgte eine Aufteilung des gesamten Messbereichs in zwei Gruppen. Als Kriterium für die Aufteilung wurde das Messergebnis des Cardiopet-Tests herangezogen. In eine Gruppe wurden die Cardiopet und die zugehörigen Vetsign-Test Ergebnisse eingeteilt bis zu einem Cardiopet-Test Ergebnis von maximal 800 pmol/l. Einer zweiten Gruppe wurden die Ergebnisse beider Tests zugeordnet, wenn das Cardiopet-Test Ergebnis über 800 pmol/l lag. In dem Bereich bis 800 pmol/l lieferten beide Tests ähnliche Ergebnisse (Mittelwert Cardiopet-Test: 380 pmol/l; Mittelwert Vetsign-Test: 356 pmol/l). Der Cardiopet-Test lieferte nur geringfügig höhere Ergebnisse, welche nicht signifikant waren. Allerdings war der Korrelationskoeffizient mit einem Wert von 0,35 relativ gering. Anders hingegen verhielt es sich in dem Messbereich über 800 pmol/l. Hier erzielte der Cardiopet-Test deutlich höhere Werte, welche statistisch signifikant waren. Ebenso lag mit 0,71 wieder ein relativ hoher Korrelationskoeffizient vor. Die Abbildungen 4 - 6 zeigen Bland-Altman Diagramme. In diesen ist die Differenz zwischen dem Messergebnis des Cardiopet und des Vetsign-Tests gegenüber dem Mittelwert beider Methoden dargestellt. Die Limits of Agreement werden als separate Linien ($\pm 1,96$ Standardabweichung der mittleren Differenz) dargestellt. Abbildung 4 stellt dieses für den gesamten Messbereich dar, die Abbildungen 5 und 6 für ein Cardiopet-Test Ergebnis < 800 pmol/l respektive > 800 pmol/l. Einen Überblick über Mittelwerte, Korrelation und Signifikanz gibt Tabelle 8. Es stellt sich heraus, dass für die Proben, deren Cardiopet-Test Ergebnis maximal 800 pmol/l beträgt, im Vetsign-Test ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Somit liefern beide Tests im niedrigen Bereich vergleichbare Ergebnisse. Im Gegensatz dazu sind die Testergebnisse des Vetsign-Tests, bei den Proben, die im Cardiopet-Test ein Ergebnis von über 800 pmol/l erzielt haben, statistisch signifikant niedriger.

Tabelle 8: NT-proBNP Mean (= Mittelwert) in pmol/l, Korrelation, Signifikanz und Probenanzahl des Cardiopet und des Vetsign-Tests für drei verschiedene Messbereiche (N = Anzahl der Untersuchungen).

	Test	Mean	Korrelation	Signifikanz	N
Gesamter Messbereich	Cardiopet	1059	0,81	0,000	557
	Vetsign	763			
Cardiopet < 800 pmol/l	Cardiopet	379	0,35	0,125	312
	Vetsign	340			
Cardiopet > 800 pmol/l	Cardiopet	1924	0,72	0,000	245
	Vetsign	1281			

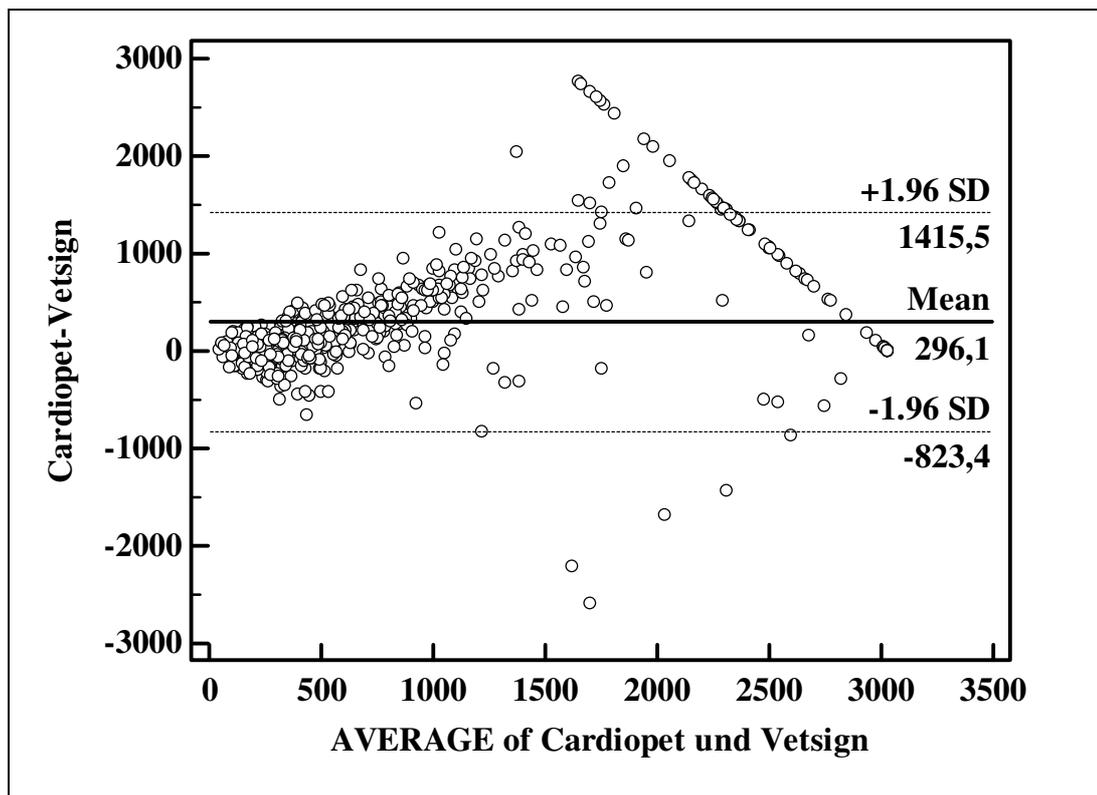


Abbildung 4: Bland-Altman Plot der NT-proBNP-Konzentration in pmol/l des Cardiopet und des Vetsign-Tests von 557 Untersuchungen des gesamten Messbereichs. Auf der x-Achse wird die Differenz beider Testergebnisse gegenüber dem Mittelwert (= Mean) beider Methoden auf der y-Achse dargestellt. Die Differenz des Mittelwertes ist als durchgehende Linie, die Limits of Agreement ($\pm 1,96$ SD = Standardabweichung) sind als gestrichelte Linien dargestellt.

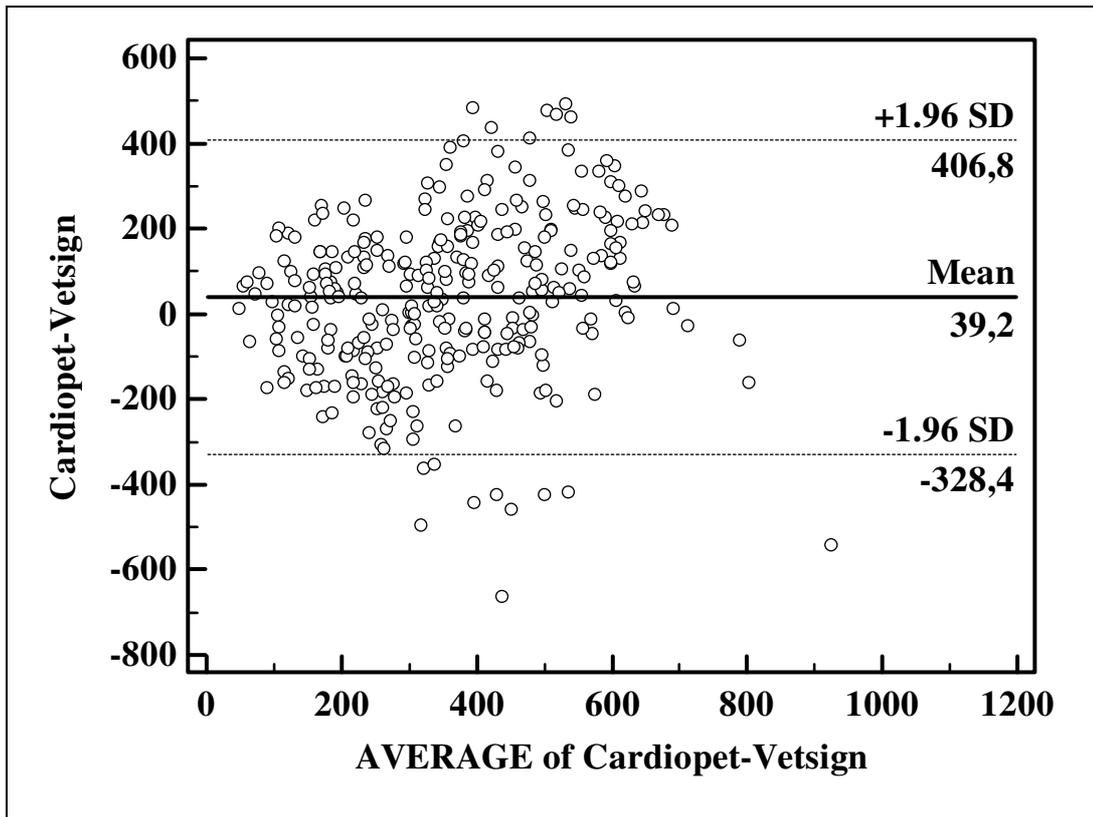


Abbildung 5: Bland-Altman Plot der NT-proBNP-Konzentration in pmol/l des Cardiopet und des Vetsign-Tests von 312 Untersuchungen. Eingeschlossen sind hier die Werte beider Tests bis zu einem Cardiopet-Testergebnis von 800 pmol/l. Auf der x-Achse wird die Differenz beider Testergebnisse gegenüber dem Mittelwert (= Mean) beider Methoden auf der y-Achse dargestellt. Die Differenz des Mittelwertes ist als durchgehende Linie, die Limits of Agreement ($\pm 1,96$ SD = Standardabweichung) sind als gestrichelte Linien dargestellt.

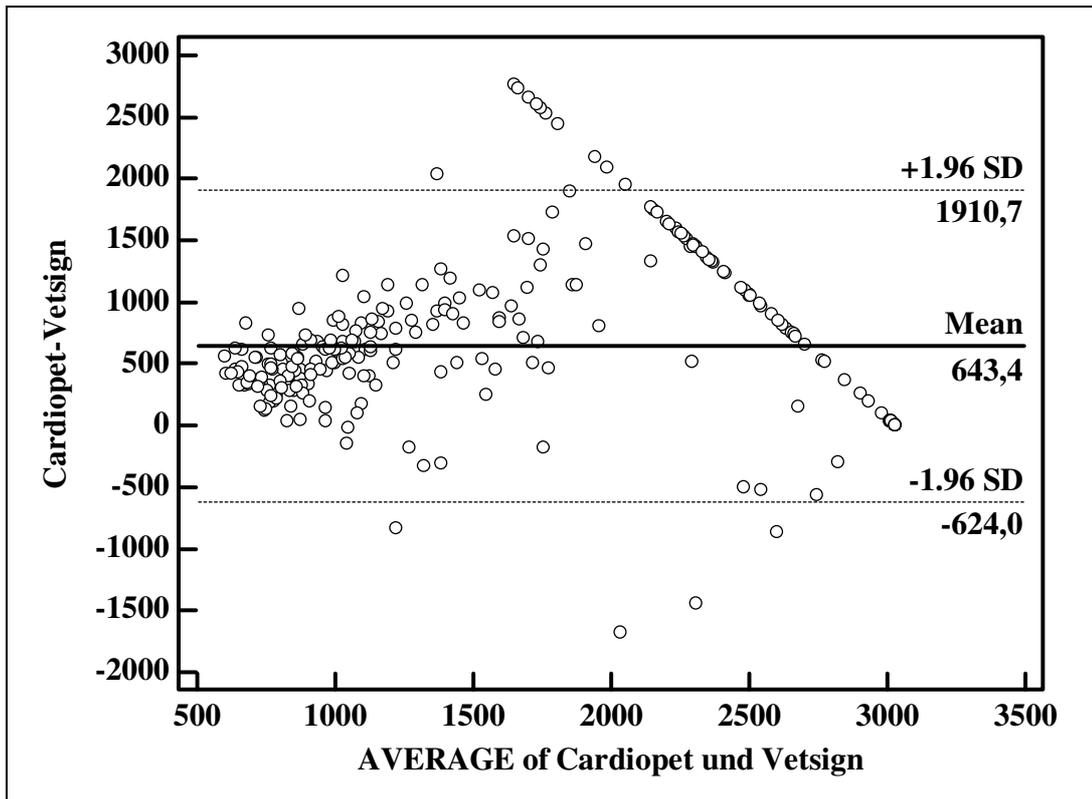


Abbildung 6: Bland-Altman Plot der NT-proBNP-Konzentration in pmol/l des Cardiopet und des Vetsign-Tests von 245 Untersuchungen. Eingeschlossen sind hier die Werte beider Tests ab einem Cardiopet-Testergebnis > 800 pmol/l. Auf der x-Achse wird die Differenz beider Testergebnisse gegenüber dem Mittelwert (= Mean) beider Methoden auf der y-Achse dargestellt. Die Differenz des Mittelwertes ist als durchgehende Linie, die Limits of Agreement ($\pm 1,96$ SD = Standardabweichung) sind als gestrichelte Linien dargestellt.

2.5. Referenzwert

Der Referenzwert wurde anhand der herzgesunden Kontrollgruppe bestimmt. In diese wurden alle gesunden Hunde über fünf Jahre eingeschlossen. Es flossen somit 196 Untersuchungen von 125 Hunden in die Berechnungen ein. Die Messwerte lagen zwischen 2 pmol/l und 1442 pmol/l. Als Mittelwert ergab sich 437 pmol/l. Die Standardabweichung lag bei ± 320 pmol/l. Der obere Referenzwert errechnet sich aus Mittelwert + 2 x Standardabweichung. Somit liegt der Referenzwert bei 1079 pmol/l.

2.6. Vergleich der Krankheitsstadien

Es erfolgte ein Vergleich der NT-proBNP-Werte der unterschiedlichen Krankheitsstadien. Tabelle 9 zeigt den Mittelwert, den Median, die Standardabweichung, sowie Minimum und Maximum der Werte.

Tabelle 9: Darstellung der NT-proBNP-Werte der einzelnen Gruppen in pmol/l bei einer Untersuchungsanzahl von 551 (mean = Mittelwert, Std = Standardabweichung, Min. = Minimum, Max. = Maximum, N = Anzahl der Untersuchungen, VES = Ventrikuläre Extrasystolen).

	Mean	Median	Std	Min.	Max.	N
gesund	437	356	320	2	1442	196
last normal	980	815	691	102	3030	27
VES	949	716	762	54	3030	129
Echo- veränderungen	1411	1275	877	220	3030	51
Echo- veränderungen + VES	1935	1895	935	482	3030	113
dekompensiert	2849	3030	509	981	3030	35

Der NT-proBNP Mittelwert der gesunden Gruppe in Höhe von 437 pmol/l war statistisch signifikant niedriger als die Mittelwerte aller Gruppen der erkrankten Hunde. Außerdem lag zu dem Mittelwert der „last normal“ Gruppe ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied vor. Für den NT-proBNP Mittelwert dieser Gruppe wurde ein Wert von 983 pmol/l berechnet. Die NT-proBNP-Werte aller vier Krankheitsgruppen unterschieden sich signifikant voneinander. Der Mittelwert der Gruppe, die „ausschließlich VES“ zeigte, war mit 949 pmol/l statistisch signifikant niedriger als die Werte der anderen drei Krankheitsgruppen. Es lag in diesem Fall kein signifikanter Unterschied zur „last normal“ Gruppe vor. Ebenso war der Mittelwert der Gruppe mit „ausschließlich Echoveränderungen“

in Höhe von 1411 pmol/l nicht signifikant höher als die NT-proBNP-Konzentration der „last normal“ Gruppe. Der Mittelwert der Gruppe mit „Echoveränderungen und VES“ betrug 1935 pmol/l und die „dekompensierte“ Gruppe wies einen Mittelwert von 2849 pmol/l auf. Bei diesen beiden Gruppen lag ein signifikanter Unterschied zur „last normal“ Gruppe vor.

NT-proBNP-Werte > 3000 pmol/l traten bei 20 von 23 Hunden der „dekompensierten“ Gruppe, bei 22 von 53 Hunden der Gruppe mit „Echoveränderungen und VES“, bei 6 von 29 Hunden der Gruppe mit „ausschließlich Echoveränderungen“ und bei 5 von 55 Hunden der Gruppe mit „ausschließlich VES“ auf. Dieses wird in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Darstellung der NT-proBNP Maximalwerte > 3000 pmol/l in den verschiedenen Stadien (VES = Ventrikuläre Extrasystolen).

Stadium Final	Hunde insgesamt	Anzahl Hunde > 3000 pmol/l	Anteil in %
VES	55	5	9,1
Echo	29	6	20,7
Echo + VES	53	22	41,5
Dekompensiert	22	20	90,9

Von den 33 Hunden der Gruppen „ausschließlich VES“, „ausschließlich Echoveränderungen“ sowie „Echoveränderungen und VES“, bei denen eine NT-proBNP-Konzentration > 3000 pmol/l festgestellt worden ist, starben 14 Hunde aufgrund einer kardialen Ursache. Zehn Hunde starben am Sekudentod, vier Hunde am kongestiven Herzversagen bzw. wurden deshalb euthanasiert. Neun Hunde starben aufgrund nicht kardialer Ursachen. Bei zwei Tieren davon wurde eine Euthanasie aufgrund einer Neoplasie vorgenommen, bei den verbleibenden sieben Hunden war die genaue Todesursache unbekannt. Zehn Hunde waren bei Studienende noch am Leben. Durchschnittlich waren seit der letzten NT-proBNP Messung acht Monate vergangen. Tabelle 11 gibt die maximalen Überlebenszeiten nach erstmaliger Feststellung einer NT-proBNP-Konzentration > 3000 pmol/l an.

Tabelle 11: Darstellung der Überlebenszeiten und der Todesursache der Hunde mit NT-proBNP-Werten > 3000 pmol/l aus den verschiedenen Stadien (N = Anzahl der Hunde, Max. = Maximum, Mon. = Monate, CHF = Kongestives Herzversagen, Urs. = Ursache).

N	33	Max. 6 Wochen	Max. 6 Mon.	Max. 12 Mon.	Max. 18 Mon.
Sekudentod	10	4	3	2	1
CHF	4	1	1	1	1
Tod wg. anderer Urs.	9	0	4	3	2
am Leben	10				

Von den 20 Hunden der „dekompensierten“ Gruppe mit einer NT-proBNP-Konzentration > 3000 pmol/l, starben bzw. wurden neun Hunde aufgrund des kongestiven Herzversagens euthanasiert, zwei Hunde starben am Sekudentod. Sechs Hunde starben aufgrund einer nicht kardialen Ursache und für drei Hunde lagen keine weiteren Informationen vor. Tabelle 12 gibt die maximalen Überlebenszeiten nach erstmaliger Feststellung einer NT-proBNP-Konzentration > 3000 pmol/l an.

Tabelle 12: Darstellung der Überlebenszeiten und der Todesursache der Hunde mit NT-proBNP-Werten > 3000 pmol/l aus der dekompensierten Gruppe (N = Anzahl der Hunde, Max. = Maximum, Mon. = Monate, CHF = Kongestives Herzversagen, Urs. = Ursache).

N	20	max. 6 Wochen	max. 6 Mon.	max. 12 Mon.	max. 25 Mon.
Sekudentod	2	2	0	0	0
CHF	9	2	2	4	1
Tod andere Urs.	6	1	5	0	0
keine Daten	3				

2.7. Cut-Off-Werte

Zur Erstellung der Cut-Off-Werte wurden 196 Untersuchungen von 125 gesunden Hunden > 5 Jahren, sowie 319 Untersuchungen von 159 erkrankten Hunden (das bedeutet Hunde der Gruppen „ausschließlich VES“, „ausschließlich Echoveränderungen“, „Echoveränderungen und VES“ und „dekompensiert“) einbezogen. Zur Unterscheidung von herzgesunden Hunden mit allen an Kardiomyopathie erkrankten Hunden wurde ein Cut-Off-Wert von 690 pmol/l als optimaler Cut-Off-Wert berechnet. Die ROC (Receiver Operating Characteristic) Kurve zeigte für diesen Wert eine AUC (Area Under The Curve) von 0,873. Die Sensitivität für diesen Wert lag bei 76,5 %, die Spezifität bei 81,6 %.

Um neue Interpretationskriterien für die Verwendung des Cardiopet-Tests als Screening-Test für die DoCM festzulegen, wurden die Werte 500 pmol/l und 1100 pmol/l hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität untersucht. Weiterhin wurden die bereits zur Interpretation bestehenden Werte von 800 pmol/l und 1800 pmol/l überprüft.

Tabelle 13 gibt die Sensitivitäten und Spezifitäten für diese verschiedenen Cut-Off-Werte an. Abbildung 7 zeigt die zugehörige ROC Kurve, in den Dot-Diagrammen in den Abbildungen 8 - 10 ist dieses graphisch dargestellt.

Tabelle 13: Darstellung der Sensitivität und Spezifität für verschiedene NT-proBNP Cut-Off-Werte in pmol/l sowie der AUC (AUC= Area under the curve).

Cut-Off	AUC	Sensitivität	Spezifität
500	0,873	86,2 %	70,0 %
690	0,873	76,5 %	81,6 %
800	0,873	69,2 %	84,7 %
1100	0,873	62,4 %	92,4 %
1800	0,873	37,6 %	100,0 %

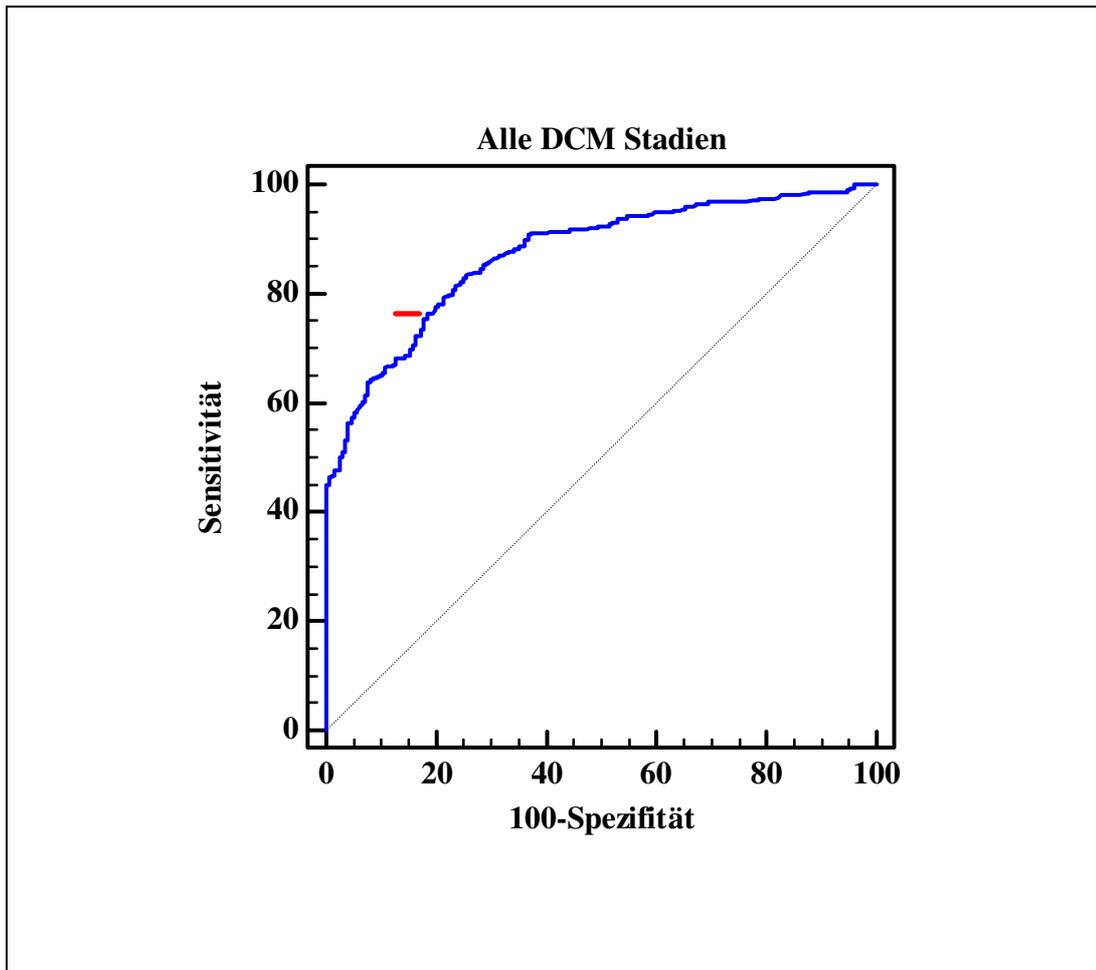


Abbildung 7: ROC-Kurve zur Differenzierung der gesunden Hunde und allen erkrankten Hunden. Auf der x-Achse ist die Sensitivität, auf der y-Achse die Spezifität dargestellt. Die rote Markierung kennzeichnet Sensitivität und Spezifität für den optimalen Cut-Off-Wert in Höhe von 690 pmol/l. AUC = 0,873 (DCM = Dilatative Kardiomyopathie, ROC = Receiver Operating Characteristic, AUC = Area under the curve).

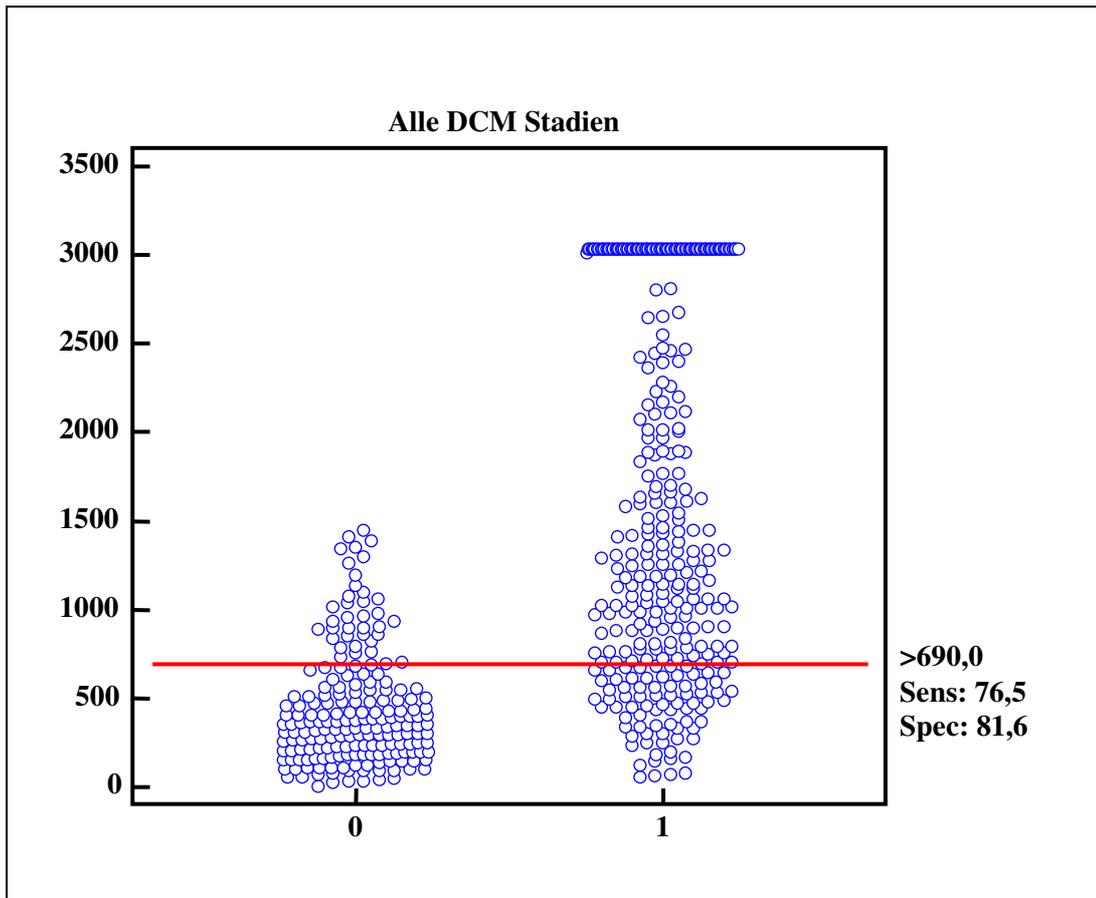


Abbildung 8: Dot-Diagramm zur Darstellung von Sensitivität und Spezifität zur Differenzierung von gesunden Hunden und allen erkrankten Hunden bei einem Cut-Off-Wert von 690,0 pmol/l. Auf der x-Achse ist die NT-proBNP-Konzentration in pmol/l und auf der y-Achse sind die zu vergleichenden Gruppen dargestellt (0 = gesunde Kontrollgruppe, 1 = alle erkrankten Hunde).

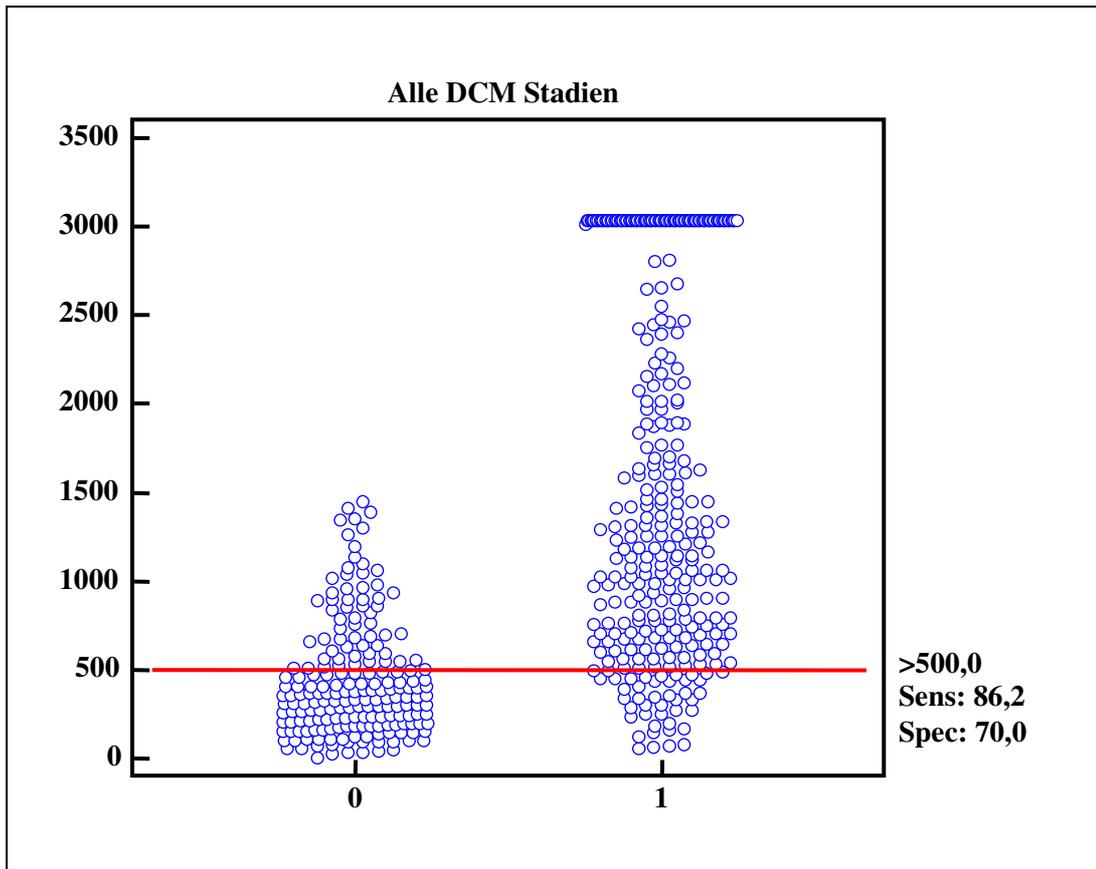


Abbildung 9: Dot-Diagramm zur Darstellung von Sensitivität und Spezifität zur Differenzierung von gesunden Hunden und allen erkrankten Hunden bei einem Cut-Off-Wert von 500,0 pmol/l. Auf der x-Achse ist die NT-proBNP-Konzentration in pmol/l und auf der y-Achse sind die zu vergleichenden Gruppen dargestellt (0 = gesunde Kontrollgruppe, 1 = alle erkrankten Hunde).

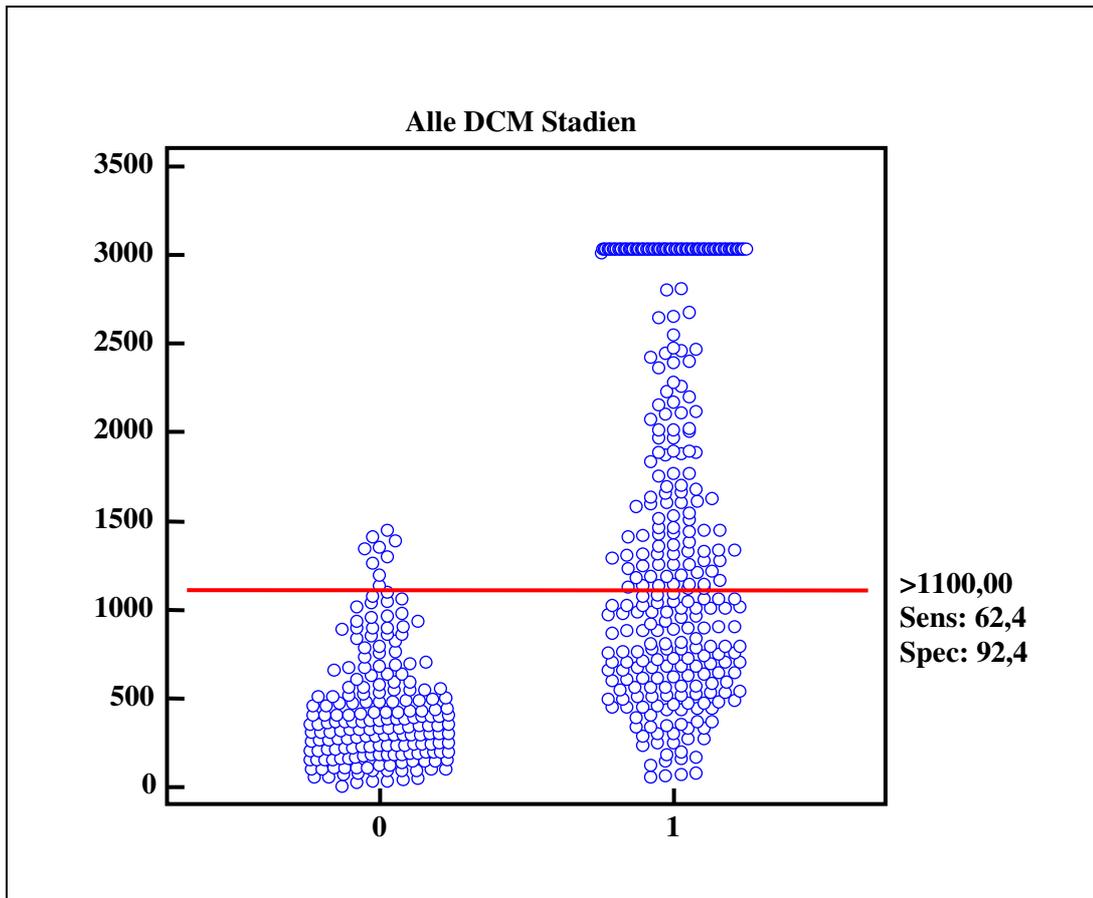


Abbildung 10: Dot-Diagramm zur Darstellung von Sensitivität und Spezifität zur Differenzierung von gesunden Hunden und allen erkrankten Hunden bei einem Cut-Off-Wert von 1100,0 pmol/l. Auf der x-Achse ist die NT-proBNP-Konzentration in pmol/l und auf der y-Achse sind die zu vergleichenden Gruppen dargestellt (0 = gesunde Kontrollgruppe, 1 = alle erkrankten Hunde).

Zur Überprüfung dieser Cut-Off-Werte wurde die Anzahl der falsch-positiven sowie der falsch-negativen Untersuchungen berechnet. Um detaillierte Informationen über die falsch-negativen Untersuchungen zu erhalten, wurden diese entsprechend des zugrundeliegenden Erkrankungsstadiums aufgeteilt. Die Tabellen 14 und 15 stellen die Ergebnisse dar. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Cut-Off-Wert isoliert, in diesem Fall 690 pmol/l, nur begrenztes diagnostisches Potential hat. Wird dieser Wert verwendet, so werden zwar wenige Hunde als falsch-positiv eingestuft, aber fast ein Viertel der erkrankten Tiere wird übersehen.

Verwendet man hingegen 500 pmol/l als unteren Cut-Off-Wert werden nur 13,5 % der Hunde falsch-negativ klassifiziert. Somit erscheint eine Erkrankung bei einem NT-proBNP-Wert von unter 500 pmol/l unwahrscheinlich. Ab einer NT-proBNP-Konzentration von 1100 pmol/l ist das Vorliegen einer Erkrankung sehr

wahrscheinlich, nur 4,5 % der Hunde mit einem Wert in dieser Höhe sind falsch-positiv klassifiziert. Als Graubereich wird der Konzentrationsbereich zwischen 500 und 1100 pmol/l definiert. In diesem Bereich kann das Vorliegen einer Erkrankung nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 14: Darstellung der absoluten und prozentualen Anzahl falsch-positiver sowie falsch-negativer Untersuchungen für verschiedene NT-proBNP Cut-Off-Werte in pmol/l bei gesunden und an allen Formen der DoCM erkrankten Hunden. (DoCM = Dobermann-Kardiomyopathie).

Cut-Off-Wert	Falsch-positiv	Falsch-negativ
500	60 (30,6 %)	43 (13,5 %)
690	36 (18,4 %)	75 (23,5 %)
1100	9 (4,5 %)	136 (42,6 %)

Um eine präzise Aussage über die falsch-negativen Untersuchungen machen zu können, wurde die Zugehörigkeit zum jeweiligen Erkrankungsstadium ermittelt. Hier stellte sich heraus, dass bei allen betrachteten Cut-Off-Werten die Anzahl der falsch-negativen Untersuchungen in der Gruppe „ausschließlich VES“ deutlich überrepräsentiert war. Es traten mehr falsch-negative Untersuchungen in der Gruppe „Echoveränderungen und VES“ als in der Gruppe „ausschließlich Echoveränderungen“ auf.

Tabelle 15: Darstellung der Anzahl falsch-negativer Untersuchungen in Abhängigkeit vom jeweiligen Erkrankungsstadium für verschiedene NT-proBNP Cut-Off-Werte in pmol/l bei gesunden und an allen Formen der DoCM erkrankten Hunden (DoCM = Dobermann-Kardiomyopathie, VES = Ventrikuläre Extrasystolen)

Stadium final	500	690	1100
VES	41	62	87
Echo	0	5	15
Echo + VES	2	8	33
Dekompensiert	0	0	1
Gesamtzahl	43	75	136

Zur Vorhersage von Echoveränderungen sollte ein möglichst sensitiver Cut-Off-Wert verwendet werden. Eine hohe Sensitivität liegt bei einem Cut-Off-Wert von 500 pmol/l vor. Diese beträgt 98,9 %, die Spezifität für diesen Cut-Off-Wert liegt bei 69,9 %. Zusätzlich wurde noch die Sensitivität und Spezifität für einen Cut-Off-Wert in Höhe von 690 pmol/l und von 1100 pmol/l für Hunde mit Echoveränderungen berechnet. Die Werte sind in Tabelle 16 dargestellt. Dieses wird in der ROC Kurve in Abbildung 11 und in den Dot-Diagrammen in den

Abbildungen 12 – 14 dargestellt.

Tabelle 16: Darstellung der Sensitivität und Spezifität für verschiedene NT-proBNP Cut-Off-Werte in pmol/l für Hunde mit Echoveränderungen sowie der AUC (AUC= Area under the curve).

Cut-Off-Wert	AUC	Sensitivität	Spezifität
500	0,96	98,9 %	69,9 %
690	0,96	93,2 %	81,6 %
1100	0,96	74,2 %	95,4 %

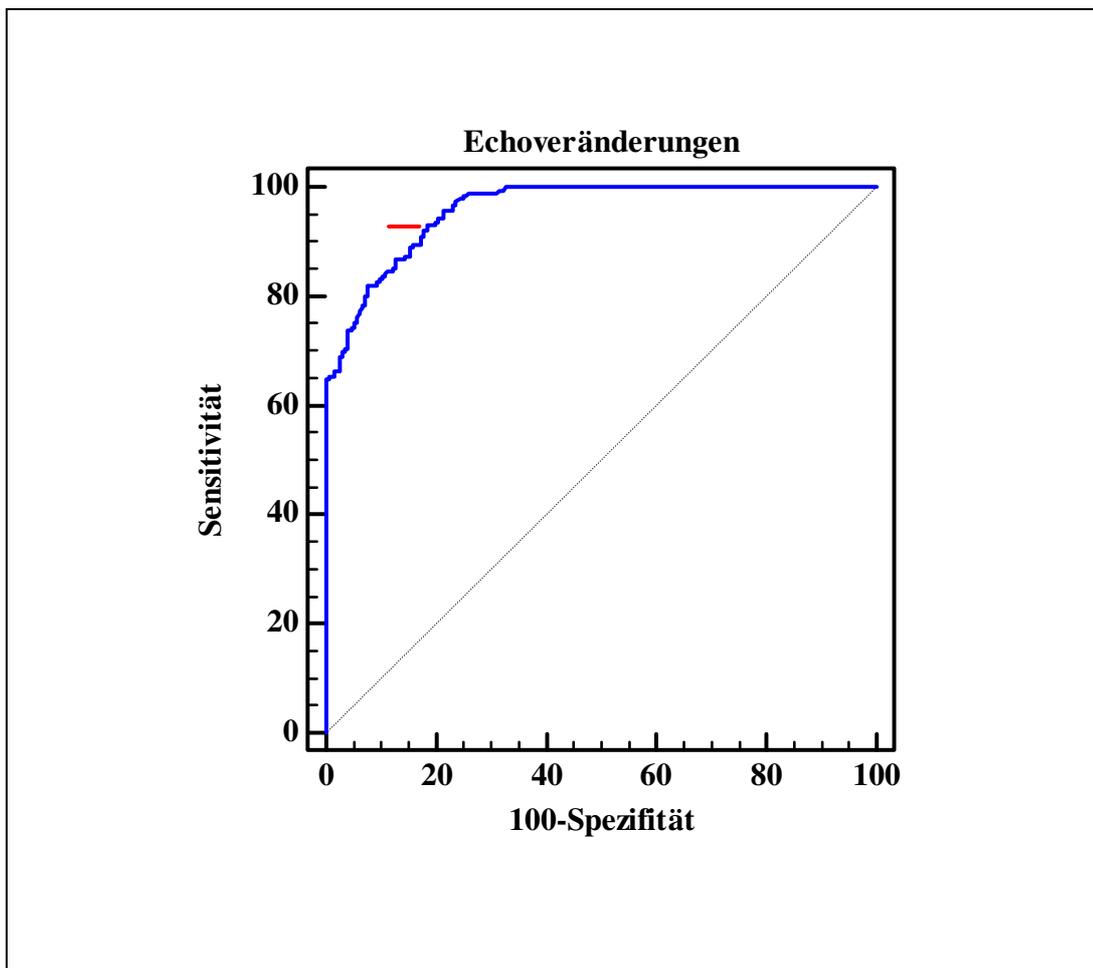


Abbildung 11: ROC-Kurve zur Differenzierung der gesunden Hunde von Hunden mit Echoveränderungen. Auf der x-Achse ist die Sensitivität, auf der y-Achse die Spezifität dargestellt. Die rote Markierung kennzeichnet Sensitivität und Spezifität für den optimalen Cut-Off-Wert in Höhe von 690 pmol/l. AUC = 0,960 (ROC = Receiver Operating Characteristic, AUC = Area under the curve).

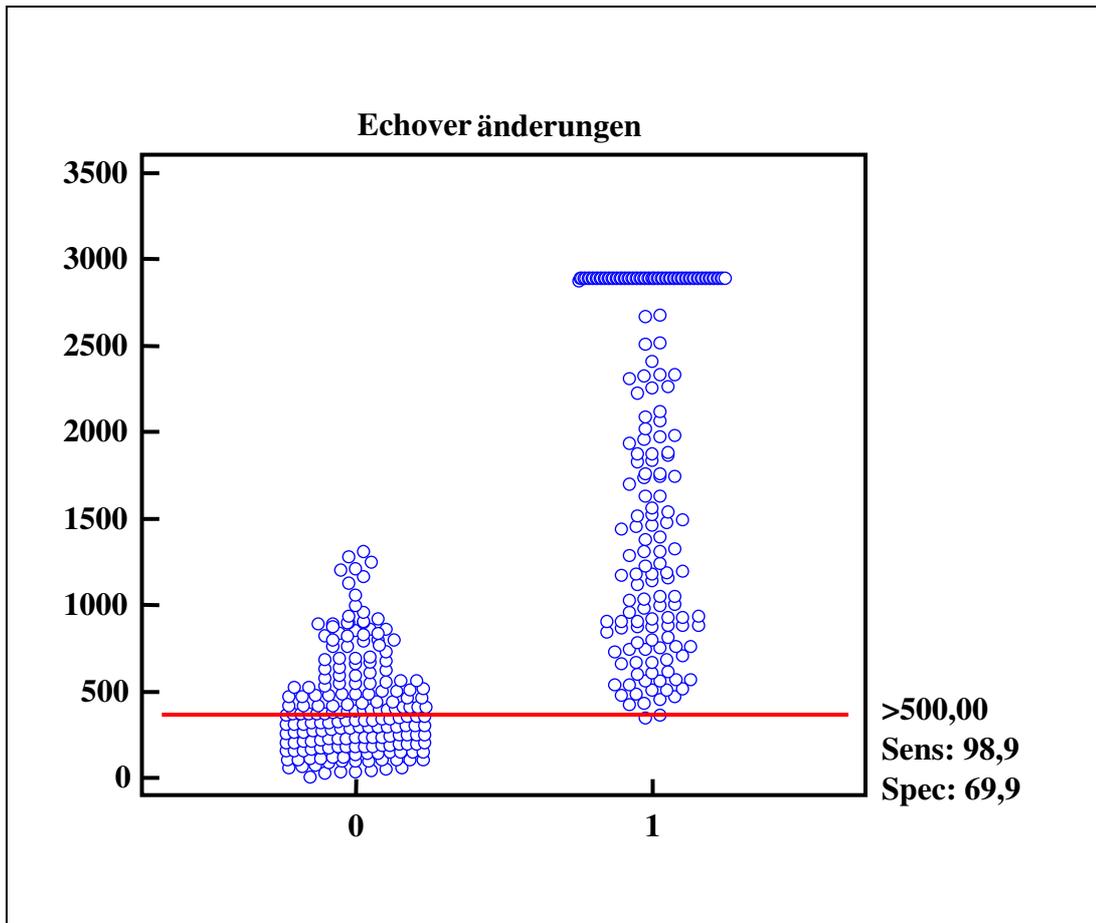


Abbildung 12: Dot-Diagramm zur Darstellung von Sensitivität und Spezifität zur Differenzierung der gesunden Hunde von Hunden mit Echoveränderungen bei einem Cut-Off-Wert von 500 pmol/l. Auf der x-Achse ist die NT-proBNP-Konzentration in pmol/l und auf der y-Achse sind die zu vergleichenden Gruppen dargestellt (0 = gesunde Kontrollgruppe, 1 = Hunde mit Echoveränderungen).

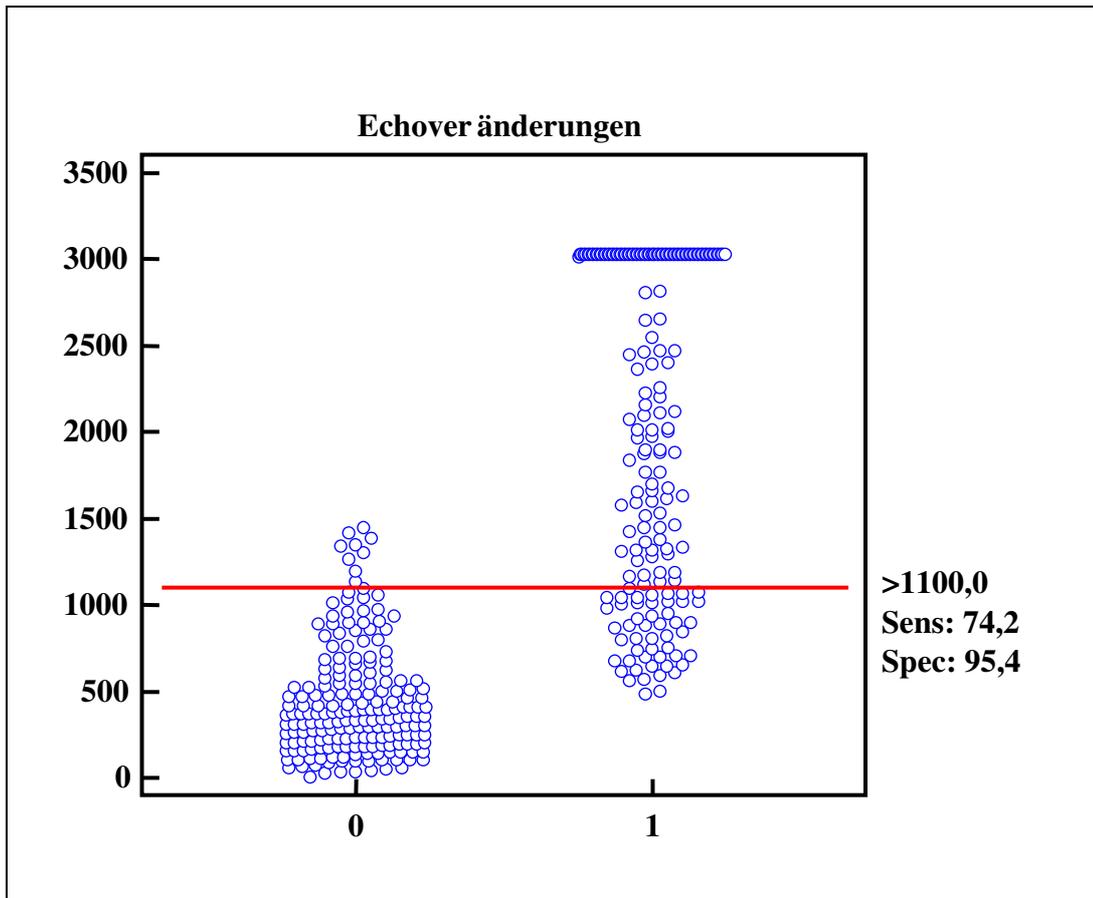


Abbildung 14: Dot-Diagramm zur Darstellung von Sensitivität und Spezifität zur Differenzierung der gesunden Hunde von Hunden mit Echoveränderungen bei einem Cut-Off-Wert von 1100 pmol/l. Auf der x-Achse ist die NT-proBNP-Konzentration in pmol/l und auf der y-Achse sind die zu vergleichenden Gruppen dargestellt (0 = gesunde Kontrollgruppe, 1 = Hunde mit Echoveränderungen).

Die Tabellen 17 und 18 stellen die falsch-positiven und falsch-negativen Untersuchungen von Hunden mit Echoveränderungen dar. Dazu wurden die Hunde, die dem Stadium „ausschließliche VES“ angehörten, ausgeschlossen.

Tabelle 17: Darstellung der absoluten und prozentualen Anzahl falsch-positiver sowie falsch-negativer Untersuchungen für verschiedene NT-proBNP Cut-Off-Werte in pmol/l für gesunde Hunde und solche mit echokardiographischen Veränderungen.

Cut-Off-Wert	Falsch-positiv	Falsch-negativ
500	60 (30,6 %)	2 (1,1 %)
690	36 (18,4 %)	13 (6,8 %)
1100	9 (4,5 %)	49 (25,7 %)

Werden die falsch-negativen Untersuchungen wieder eingehend betrachtet, so tritt ein Großteil dieser Untersuchungen in dem Stadium „Echoveränderungen und VES“ auf. Untersuchungen von Hunden die nur Echoveränderungen aufweisen

sind deutlich weniger falsch-negativ.

Tabelle 18: Darstellung der Anzahl falsch-negativer Untersuchungen in Abhängigkeit vom jeweiligen Erkrankungsstadium für verschiedene NT-proBNP Cut-Off-Werte in pmol/l bei gesunden Hunden und solchen mit echokardiographischen Veränderungen. (VES = Ventrikuläre Extrasystolen)

Stadium final	500	690	1100
Echo	0	5	15
Echo + VES	2	8	33
Dekompensiert	0	0	1
Gesamtzahl	2	13	49

3. Follow-Up

Die Follow-Up Untersuchungen wurden zum einen für gesunde Hunde mit einer NT-proBNP-Konzentration > 400 pmol/l und zum anderen für erkrankte Hunde mit einer NT-proBNP-Konzentration < 400 pmol/l durchgeführt.

3.1. Gesunde Hunde

Es wurden 36 ursprünglich gesunde Hunde mit einer NT-proBNP-Konzentration von > 400 pmol/l eingeschlossen. Damit ein direkter Vergleich der Testergebnisse möglich war, wurde, wie in der ersten Studie, der Vetsign-Test verwendet, da der Cardiopet-Test, wie bereits beschrieben, höhere Werte liefert. Ein Cut-Off-Wert von 400 pmol/l wurde verwendet, weil dieser in der vorherigen Publikation als Cut-Off-Wert zur Unterscheidung von gesunden und kranken Hunden errechnet worden war (WESS et al., 2011a). Eine Follow-Up Untersuchung fand frühestens nach zwölf Monaten statt. Lediglich drei Hunde erkrankten, zwei im Zeitraum von 12 – 24 Monaten nach der festgestellten erhöhten NT-proBNP-Konzentration und ein Hund im Zeitraum von 24 – 36 Monaten danach. Von den verbleibenden 33 Hunden waren 19 nach einem Zeitraum von mehr als 36 Monaten nach der Messung der erhöhten NT-proBNP-Konzentration immer noch gesund. Ebenso traf dieses auf sechs Hunde nach einem Zeitraum von mehr als 24 Monaten und auf acht Hunde nach 12 – 24 Monaten zu. Dieses ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Darstellung des Gesundheitsstatus der Hunde der Follow-Up Untersuchungen (N = Anzahl der Hunde).

Follow-Up nach:	Gesund	Krank
12-24 Monaten	8	2
> 24 Monaten	6	1
> 36 Monaten	19	0
N	33	3

Wird der Verlauf der NT-proBNP-Werte der gesunden 33 Hunde in den Follow-Up Untersuchungen betrachtet, so ist festzustellen, dass bei 18 Hunden die NT-proBNP-Konzentration wieder unter einen Wert von 400 pmol/l fällt. Bei zwölf Hunden bleibt ein erhöhter Wert über 400 pmol/l bestehen. Bei drei Hunden liegt kein weiterer NT-proBNP-Wert vor. Die Abbildungen 15 und 16 geben einen Überblick über den Verlauf der NT-proBNP-Konzentration. Aufgrund der besseren Übersicht wurden die Daten auf zwei Diagramme aufgeteilt. Ein extremer Wert der von 1325 pmol/l auf 2596 pmol/l angestiegen ist, ist aufgrund der besseren Darstellung nicht im Diagramm enthalten. Bei diesem Hund wurde 24 Monate nach der Feststellung dieses extrem hohen NT-proBNP-Wertes ein verdächtiger Befund in der echokardiographischen Untersuchung festgestellt. Die Tabellen mit den jeweiligen NT-proBNP-Werten der einzelnen Hunde befinden sich im Anhang, dabei handelt es sich um die Tabellen 24 und 25.

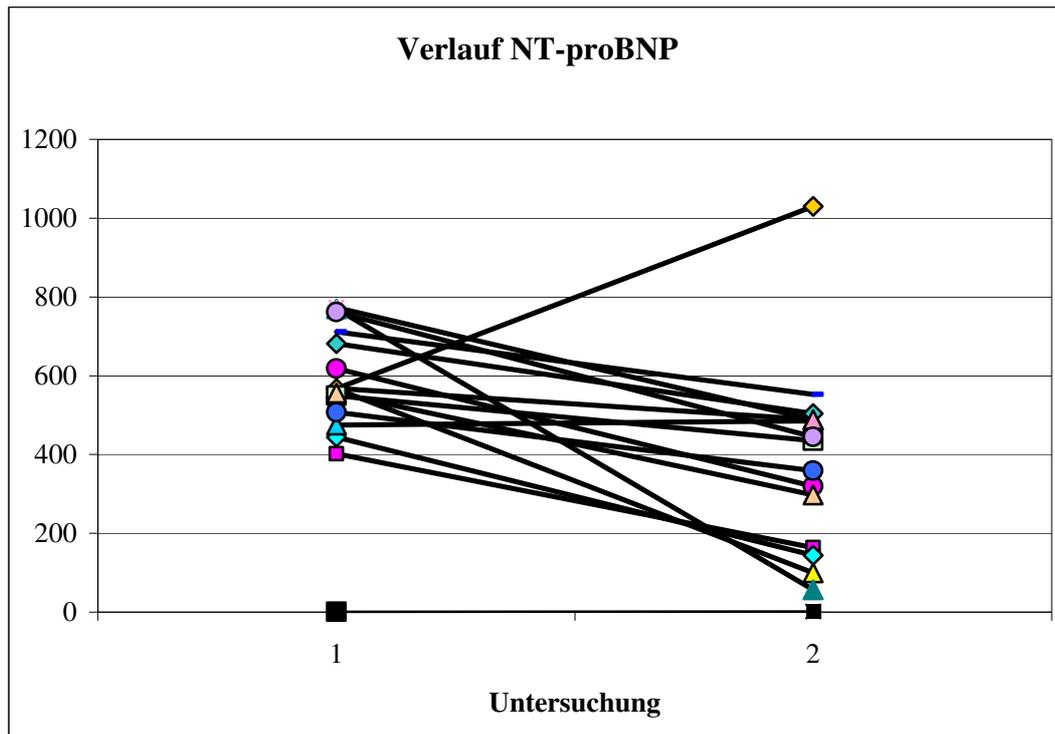


Abbildung 15: Darstellung des Verlaufs der NT-proBNP-Konzentration der gesunden Hunde, deren Ausgangskonzentration > 400 pmol/l lag. Auf der x-Achse ist die NT-proBNP-Konzentration in pmol/l und auf der y-Achse erste und zweite Untersuchung dargestellt. (1 = erste Untersuchung, 2 = zweite Untersuchung).

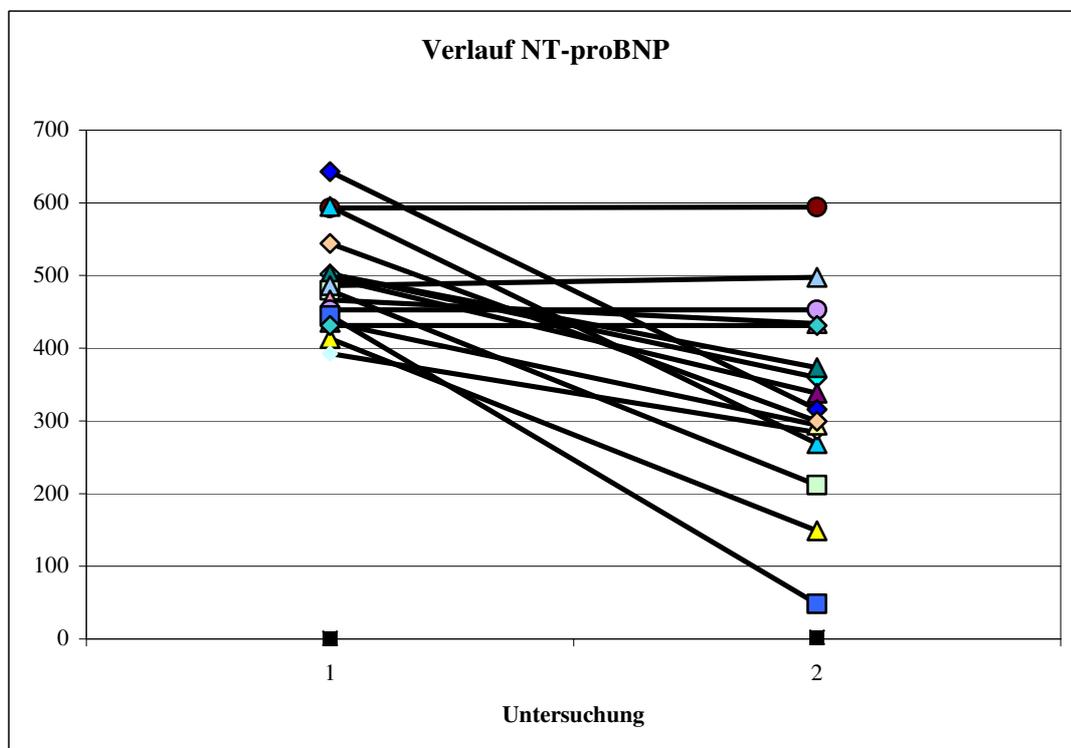


Abbildung 16: Darstellung des Verlaufs der NT-proBNP-Konzentration der gesunden Hunde, deren Ausgangskonzentration > 400 pmol/l lag. Auf der x-Achse ist die NT-proBNP-Konzentration in pmol/l und auf der y-Achse erste und zweite Untersuchung dargestellt (1 = erste Untersuchung, 2 = zweite Untersuchung).

3.2. Kranke Hunde

Es wurden 31 Hunde, die den Erkrankungsstadien „ausschließlich VES“, „ausschließlich Echoveränderungen“ oder „Echoveränderungen und VES“ zugeordnet waren und eine NT-proBNP-Konzentration < 400 pmol/l aufwiesen, einbezogen. Da es von einigen Hunden mehrfach Untersuchungen gab, flossen insgesamt 56 Untersuchungen mit einer NT-proBNP-Konzentration < 400 pmol/l ein. Bei 45 von diesen 56 Untersuchungen befanden sich die Hunde im Krankheitsstadium „ausschließlich VES“. In acht Untersuchungen lag das Stadium „Echoveränderungen und VES“ vor und in drei Untersuchungen das Stadium „ausschließlich Echoveränderungen“. Tabelle 20 stellt dieses dar.

Tabelle 20: Darstellung der Anzahl der Untersuchungen der Hunde in den einzelnen Stadien (VES = Ventrikuläre Extrasystolen, US = Untersuchung).

Stadium Final	Anzahl der US	Anteil in Prozent
VES	45	80,36 %
Echoveränderungen	3	5,36 %
Echoveränderungen + VES	8	14,28 %
Gesamt	56	

Für 21 dieser Hunde lagen mehrfach Follow-Up Untersuchungen vor. Daher zeigte sich im weiteren Verlauf dieser Untersuchungen, dass bei 15 dieser Hunde die NT-proBNP-Konzentration auf > 400 pmol/l anstieg, bei den verbleibenden sechs Hunden wurde dieser Wert auch in nachfolgenden Untersuchungen nicht erreicht. Werden die 15 Hunde betrachtet, bei denen das NT-proBNP in der ersten Follow-Up Untersuchung einen Wert von > 400 pmol/l erreicht hat, so wird festgestellt, dass bei vier Hunden im Rahmen der nächsten Follow-Up Untersuchung wieder eine NT-proBNP-Konzentration von < 400 pmol/l festgestellt wurde. Bei sechs Hunden blieb der Wert über 400 pmol/l bestehen, bei fünf Hunden liegen keine mehrfachen Follow-Up Untersuchungen vor. Einen Überblick über den Verlauf der NT-proBNP-Konzentration gibt Tabelle 21 sowie die Abbildungen 17 und 18. Die Daten wurden wieder aufgrund der besseren Übersicht auf zwei Diagramme aufgeteilt. Die Tabellen mit den jeweiligen NT-proBNP-Werten der einzelnen Hunde befinden sich im Anhang, dabei handelt es sich um die Tabellen 26 und 27.

Tabelle 21: Darstellung des Verlaufs der NT-proBNP-Konzentration erkrankter Hunde mit einer Ausgangskonzentration < 400 pmol/l.

NT-proBNP > 400 pmol/l	Ja	→	NT-proBNP sinkt wieder < 400 pmol/l	
	15		Ja	4
	6		Nein	6
	Nein		kein weiterer Wert	5

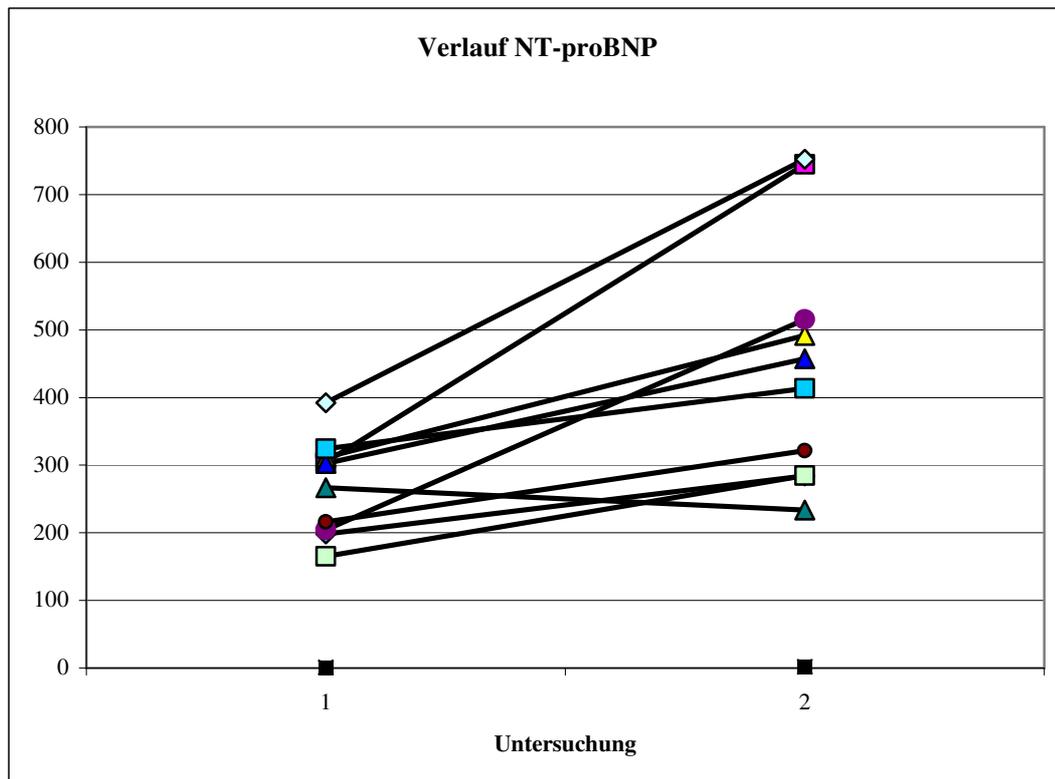


Abbildung 17: Darstellung des Verlaufs der NT-proBNP-Konzentration der erkrankten Hunde deren Ausgangskonzentration < 400 pmol/l lag. Auf der x-Achse ist die NT-proBNP-Konzentration in pmol/l und auf der y-Achse erste und zweite Untersuchung dargestellt (1 = erste Untersuchung, 2 = zweite Untersuchung).

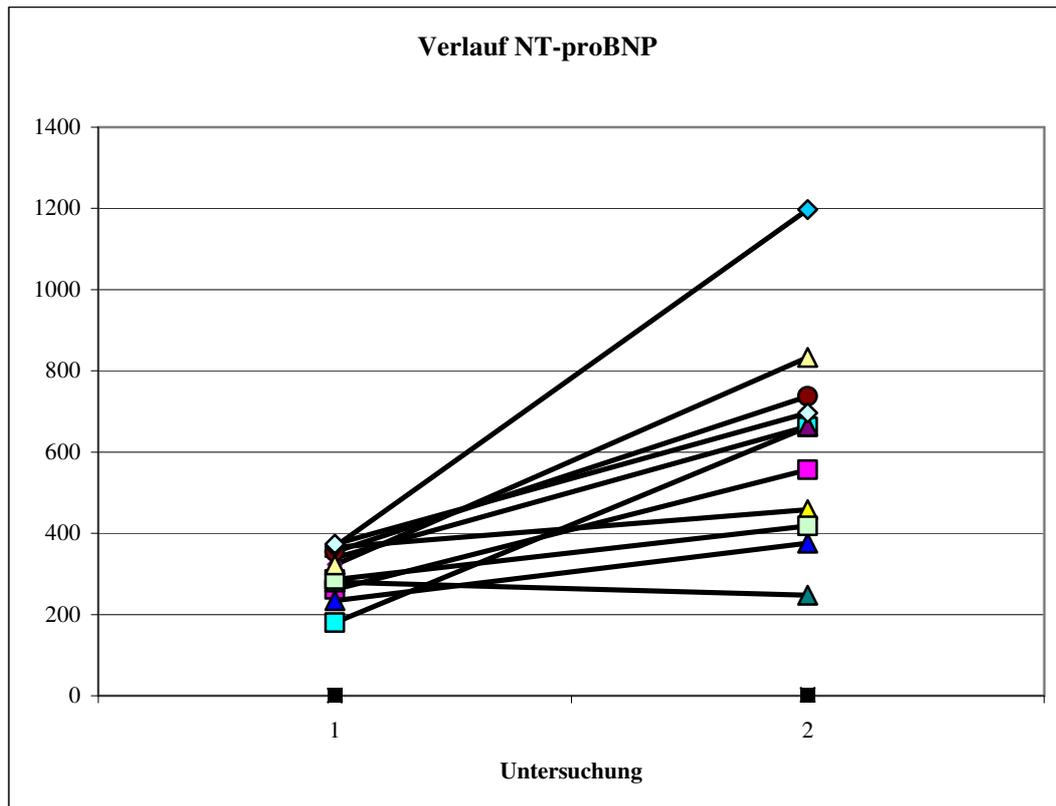


Abbildung 18: Darstellung des Verlaufs der NT-proBNP-Konzentration der erkrankten Hunde deren Ausgangskonzentration < 400 pmol/l lag. Auf der x-Achse ist die NT-proBNP-Konzentration in pmol/l und auf der y-Achse erste und zweite Untersuchung dargestellt (1 = erste Untersuchung, 2 = zweite Untersuchung).

V. DISKUSSION

NT-proBNP hat sich in der Veterinärmedizin als kardialer Biomarker besonders beim Hund und bei der Katze etabliert. In diversen Studien wurde sein diagnostisches Potential zu verschiedenen Fragestellungen evaluiert. So kann anhand der Bestimmung von NT-proBNP kardial von extrakardial bedingter Dyspnoe sowohl beim Hund (DEFRANCESCO et al., 2007; PROSEK et al., 2007; FINE et al., 2008; OYAMA et al., 2009) wie auch bei der Katze (WESS, 2008; CONNOLLY et al., 2009a; FOX et al., 2009) differenziert werden. Ein Einsatz als Screening-Test für asymptomatische Katzen mit HCM erscheint sinnvoll (WESS et al., 2011b). Bei Hunden mit asymptomatischer Mitralklappenendokardiose konnte NT-proBNP Tod oder Beginn des kongestiven Herzversagens in den folgenden zwölf Monaten vorhersagen (CHETBOUL et al., 2009). Der erfolgreiche Verschluß eines PDAs konnte durch NT-proBNP Serienmessungen kontrolliert werden (ARAMAKI et al., 2010). Diese genannten Anwendungsgebiete sind nur einige mögliche Einsatzgebiete für diesen Test. Allerdings müssen bei der Anwendung im klinischen Alltag einige Aspekte bedacht werden. Die Ergebnisse können abhängig vom Probenhandling oder der Verwendung unterschiedlicher Testkits variieren. Ebenso sollte die Fragestellung des jeweiligen Patienten in die Interpretation der Ergebnisse einbezogen werden (OYAMA & SINGLETARY, 2010).

Ein Ziel dieser Studie war der Vergleich der zwei zurzeit erhältlichen NT-proBNP-Testkits. Dabei handelte es sich um den Vetsign® Canine CardioScreen NT-proBNP-Test und den Cardiopet® proBNP Test. Bisher wurde nur der Vetsign-Test verwendet. Dieser wird aber vom Markt genommen und durch den Cardiopet-Test ersetzt. Um den Testvergleich durchführen zu können, wurde auf bei -80°C gelagerte Proben zurückgegriffen, von denen bereits NT-proBNP Ergebnisse, die mit dem Vetsign-Test bestimmt wurden, vorlagen. Diese Proben wurden in einer vorherigen Studie analysiert und die Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (WESS et al., 2011a). Im Testvergleich zeigte sich, dass die Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar sind und Cut-Off-Werte somit nicht übertragbar sind. Ein Faktor zur Umrechnung ließ sich nicht nachweisen. Zwar lag im Messbereich bis 800 pmol/l kein statistisch signifikanter Unterschied vor, doch war der Korrelationskoeffizient derart gering, dass ein direkter

Vergleich der Ergebnisse nicht zu empfehlen ist. Im Messbereich > 800 pmol/l wurden signifikant höhere Werte durch den Cardiopet-Test gemessen. Eine Validierung beider Tests erfolgte in dieser Studie nicht. Der Vetsign-Test wurde bereits in zwei Studien zum Einsatz beim Hund validiert. Bei Konzentrationen > 800 pmol/l werden je nach Studie unterschiedliche Intra- und Interassay Präzisionen angegeben wurden. Diese lagen in der einen Studie unter 10 % (BOSWOOD et al., 2008) und in der anderen zwischen 12 und 20 % (ZIEBA et al., 2008). Es besteht die Möglichkeit, dass größere Unterschiede zwischen den einzelnen Platten und Chargen vorliegen könnten. Da die NT-proBNP Messungen in dieser Studie über einen längeren Zeitraum durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass Vetsign-Testkits verschiedener Chargen verwendet wurden. Dieses könnte die Ergebnisse des Vetsign-Tests beeinflusst haben, was zur Differenz der Messergebnisse beider Tests beigetragen haben könnte. Der Cardiopet-Test wurde laut Hersteller ausreichend validiert. Diese Ergebnisse sind bisher allerdings nicht publiziert.

Da die Zeitpunkte der NT-proBNP Messung einer Probe durch beide Assays durchaus länger voneinander entfernt liegen konnten, kann eine Beeinflussung der NT-proBNP-Konzentration durch die Lagerung nicht vollkommen ausgeschlossen werden. CAULIEZ und Mitarbeiter (2008) haben die Stabilität von NT-proBNP bei zweijähriger Lagerung bei einer Temperatur von -20°C untersucht. Bei mehr als 90 % der untersuchten Proben betrug der Abbau weniger als 10 % der Ausgangskonzentration. Der maximale Abbau betrug 16 % der Ausgangskonzentration (CAULIEZ et al., 2008). In einer anderen Studie wurde die NT-proBNP-Konzentration von bei -80°C eingefrorenen feline Plasmaproben, welche bis zu zehn Jahre gelagert wurden, bestimmt. Diese Werte wurden mit aktuellen Proben von Katzen mit identischem Schweregrad der vorliegenden Erkrankung verglichen. Der Konzentrationsunterschied war gering und statistisch nicht signifikant, so dass auch durch eine mehrjährige Lagerungsdauer die NT-proBNP-Konzentration unbeeinflusst zu sein scheint (LALOR et al., 2009). Ebenso wurde eine fast 100-prozentige Immunoreaktivität nach fünfmaligem Einfrieren und erneutem Auftauen erreicht (NOWATZKE & COLE, 2003). Da die in dieser Studie verwendeten Proben maximal fünf Jahre bei -80°C gelagert worden sind und nur für die beiden Messungen aufgetaut wurden, erscheint eine Beeinflussung der NT-proBNP-Konzentration nur in geringem

Umfang wahrscheinlich. Die Differenz der Ergebnisse dürfte somit in erster Linie durch die Verwendung der zwei unterschiedlichen Assays zu erklären sein.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass NT-proBNP-Werte durch eine unzureichende Kühlung falsch-niedrig sind. Daher wurde bisher ein zeitnahes Einfrieren und ein Versand der gefrorenen Probe empfohlen (FARACE et al., 2008; COLLINS et al., 2010). Um dieses aufwendige Probenhandling zu vermeiden, wurden Protease-Inhibitoren enthaltende Probenröhrchen auf den Markt gebracht, in welchen die NT-proBNP-Konzentration laut Hersteller bis zu 24 Stunden ohne Einfrieren der Probe stabil bleibt. In dieser Studie wurde in zwei getrennten Versuchen unter unterschiedlichen Bedingungen (siehe Kapitel 4 Punkt 5.5.1. und 5.5.2.) die Stabilität des NT-proBNPs im Stabilisatorröhrchen untersucht. Das Hauptziel des Vorversuchs war herauszufinden, ob die für den Hauptversuch bereits eingefrorenen Proben zur Erreichung der optimalen Stabilität vor der NT-proBNP Messung in ein Stabilisatorröhrchen umgefüllt werden müssen. Dabei wurde eine signifikant niedrigere NT-proBNP-Konzentration im Stabilisatorröhrchen festgestellt. Diese war im Vorversuch um 37,54 % niedriger im Vergleich zur NT-proBNP-Konzentration der gefrorenen Probe ohne Stabilisator. Da zu diesem Zeitpunkt extrem hohe Umgebungstemperaturen herrschten, stellte sich zum einen die Frage, ob die reduzierte NT-proBNP-Konzentration im Stabilisatorröhrchen darauf zurückzuführen sein könnte und zum anderen ob NT-proBNP unter Praxisbedingungen in dem Stabilisatorröhrchen überhaupt stabil bleibt. Daher sollten in einem zweiten Versuch zur Stabilität des NT-proBNPs im Stabilisatorröhrchen diese Fragen geklärt werden. Die Probe im Stabilisatorröhrchen wurde bei Raumtemperatur unter konstanten Temperaturbedingungen gelagert. Auch in diesem Fall wurde eine um 38,1 % reduzierte NT-proBNP-Konzentration im Vergleich zur gefrorenen Probe festgestellt. Somit war die reduzierte NT-proBNP-Konzentration der Probe im Stabilisatorröhrchen nicht auf die Umgebungstemperatur zurückzuführen, sondern auf einen Abbau des NT-proBNPs aufgrund der unzureichenden Wirksamkeit des Protease-Inhibitors. Resultierend aus den Ergebnissen dieser Studie, sollten NT-proBNP Proben weiterhin gefroren verschickt werden, da nur so ein aussagekräftiges Ergebnis garantiert ist. In einer Studie zur Stabilität von NT-proBNP in felinem Plasma wurde die NT-proBNP-Konzentration von bei

Raumtemperatur (22°C) gelagertem Plasma mit und ohne Protease-Inhibitor verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass der Protease-Inhibitor den Abbau reduziert, aber nicht verhindern kann, so dass die klinische Interpretation des finalen Resultates dadurch beeinflusst werden kann (CONNOLLY et al., 2011a). Eine weitere Studie zum Einsatz von Stabilisatorröhrchen zeigte, dass stabilisiertes felines Plasma, welches bei 4°C 24 Stunden gekühlt wurde, im Vergleich zu bei -20°C eingefrorenem Plasma nur eine geringgradige, nicht signifikant niedrigere NT-proBNP-Konzentration aufweist (GÜNTHER et al., 2010). Da in der Studie von CONOLLY und Mitarbeiter (2011) nur der prozentuale Anteil der Proben angegeben wurde, deren NT-proBNP-Konzentration nach dem jeweiligen Zeitpunkt unter den Ausgangswert gesunken war, aber keine NT-proBNP-Konzentrationswerte, ist ein direkter Vergleich mit dieser Studie schwierig. Jedoch scheint die Tendenz der Ergebnisse ähnlich zu sein. Die Lagerung des Stabilisatorröhrchens bei 4°C wurde in dieser Studie nicht untersucht. Es wäre daher denkbar, dass unter solchen Bedingungen ähnliche Resultate möglich wären. Weiterhin sollte bedacht werden, dass es sich in dieser Studie um canines NT-proBNP handelt. Angaben über die Stabilität von caninem NT-proBNP unter Verwendung eines Protease-Inhibitors sind derzeit nicht verfügbar. In zwei Studien wurde die mediane Reduktion von caninem NT-proBNP bei 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur mit 50 % respektive 51 % angegeben (FARACE et al., 2008; COLLINS et al., 2010). Dagegen reduziert sich die mediane NT-proBNP-Konzentration in felinem Plasma unter ähnlichen Bedingungen nur um 38,4 % (CONNOLLY et al., 2011a). Daher ist nicht auszuschließen, dass auch unter Verwendung eines Protease-Inhibitors Unterschiede in der Stabilität von caninem und felinem NT-proBNP vorhanden sein können.

Ein in der Literatur beschriebener Anstieg der NT-proBNP-Konzentration durch das Einfrieren der Proben, genauer gesagt durch Veränderungen in der Molekülstruktur (COLLINS et al., 2010), konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Die Proben des Versuches zur Stabilität wurden eingefroren, die des Vorversuches nicht (siehe Kapitel 4 Punkt 5.5.1. und 5.5.2.). Die prozentuale Reduktion im Vergleich zu dem unter herkömmlichen Bedingungen gemessenen EDTA-Plasma war jedoch in beiden Versuchen annähernd gleich. Mögliche Erklärungen für die geringe Effektivität der Protease-Inhibitor enthaltenden

Stabilisatorröhrchen in dieser Studie könnte das Vorhandensein anderer Proteasen, die nicht durch den Inhibitor gehemmt werden oder eine zu geringe Konzentration des Protease-Inhibitors in dem Röhrchen sein. In einer humanmedizinischen Studie verhinderte der Protease-Inhibitor Aprotinin den NT-proBNP Abbau bei 48 Stunden dauernder Lagerung bei Raumtemperatur fast vollständig (DOWNIE et al., 1999). Um herauszufinden, ob andere Protease-Inhibitoren erfolgreich in der Veterinärmedizin eingesetzt werden können, bedarf es weiterer Studien.

Der Krankheitsverlauf der Dobermann-Kardiomyopathie besteht aus drei Phasen (CALVERT et al., 1982; CALVERT et al., 1997b; CALVERT et al., 1997a; PETRIC et al., 2002; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). In der ersten Phase ist das Herz morphologisch und elektrisch normal und es liegen keine klinischen Anzeichen vor. In der zweiten Phase können sowohl morphologische wie auch elektrische Abnormalitäten auftreten. Allerdings gehen diese Veränderungen ohne klinische Anzeichen einher, das heißt dem Besitzer präsentiert sich der Hund vollkommen normal. Neben einer linksventrikulären Dilatation treten in dieser Phase oft VES auf, die zu ventrikulären Tachykardien und zum Sekudentod durch Kammerflimmern führen können. 25 – 30 % der betroffenen Hunde sterben während der okkulten Phase am Sekudentod. (CALVERT et al., 1997b; CALVERT et al., 1997a; CALVERT et al., 1998a; CALVERT et al., 1998b; O'GRADY & HORNE, 1998; CALVERT et al., 2000a; CALVERT & JACOBS, 2000; CALVERT et al., 2000b; PETRIC et al., 2002; CALVERT & BROWN, 2004; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004; O'SULLIVAN et al., 2005; CALVERT & MEURS, 2009). Die dritte Phase ist charakterisiert durch das Auftreten von klinischen Anzeichen und geht mit kongestivem Herzversagen einher (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Für prognostische und therapeutische Zwecke sowie für einen möglichen Zuchteinsatz wäre eine möglichst frühe Diagnose der okkulten Phase enorm wichtig. Der derzeitige diagnostische Goldstandard bestehend aus 24-Stunden-EKG und Echokardiographie ist eine sehr aufwendige und teure Untersuchung, die nicht überall verfügbar ist. Die Bestimmung von kardialen Biomarkern könnte eine adäquate Alternative darstellen, da diese Untersuchung überall verfügbar und kostengünstig ist (OYAMA et al., 2007).

Der Vergleich der Ergebnisse aller Gruppen zeigte zwischen fast allen Gruppen einen statistisch signifikanten Konzentrationsunterschied. Lediglich zwischen der

„last normal“ Gruppe und der Gruppe der Hunde mit „ausschließlich VES“ lag kein signifikanter Unterschied vor. Der Gruppe „last normal“ wurde retrospektiv die letzte unauffällige Untersuchung der Hunde vor Erkrankungsbeginn zugeordnet, sofern diese nicht mehr als 18 Monate vorher stattgefunden hatte. Würde nur eine einzelne Untersuchung verwendet werden, wäre es für diesen neuen diagnostischen Test unmöglich ein aussagekräftigeres Ergebnis zu liefern als der diagnostische Goldstandard. Hunde, die eine erhöhte NT-proBNP-Konzentration aufwiesen, aber aufgrund der Ergebnisse von Holteruntersuchung und Echokardiographie als gesund klassifiziert worden waren, würden somit als falsch-positiv eingestuft werden. Daher wurde ein Follow-Up durchgeführt und die Hunde retrospektiv umklassifiziert. Obwohl es sich zu dem Zeitpunkt somit eigentlich noch um echokardiographisch und elektrokardiographisch gesunde Hunde handelt, ist im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ein statistisch signifikanter Konzentrationsunterschied vorhanden. Somit decken sich diese Ergebnisse mit einer Studie von WESS und Mitarbeitern (2011) in der ein anderer Assay verwendet wurde (WESS et al., 2011a). In diesem Fall können durch die NT-proBNP Messung Veränderungen nachgewiesen werden, die mit dem momentanen Goldstandard nicht nachweisbar sind. Somit sollten Hunde, die eine NT-proBNP-Konzentration > 500 pmol/l aufweisen, regelmäßig kontrolliert werden.

Interessant ist der hohe Maximalwert der gesunden Gruppe in Höhe von 1442 pmol/l. Für eine NT-proBNP-Konzentration von 1444 pmol/l wurde in dieser Studie eine Spezifität von 100 % berechnet. Ein weiterer gesunder Hund zeigte ebenfalls eine NT-proBNP-Konzentration > 1400 pmol/l. Diese Hunde sollten intensiv kontrolliert werden, da nicht auszuschließen ist, dass es sich bei dieser Untersuchung bereits um die letzte normale Untersuchung handelt und ein Erkrankungsbeginn unmittelbar bevorsteht. Im weiteren Verlauf der Studie wurde bei dem Hund, bei dem eine NT-proBNP-Konzentration > 1400 pmol/l festgestellt worden ist, ein Osteosarkom diagnostiziert. Der Hund mit der maximalen NT-proBNP-Konzentration in der gesunden Gruppe, war auch bei der nachfolgenden Untersuchung gesund. Die Möglichkeit, dass Konzentrationsschwankungen oder extrakardiale Ursachen für die erhöhte NT-proBNP-Konzentration verantwortlich sind, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit diskutiert.

Obwohl NT-proBNP kein besonders geeigneter Parameter zur Vorhersage von

Rhythmusstörungen zu sein scheint, ist die NT-proBNP-Konzentration der Hunde mit VES im Vergleich zur Gruppe der gesunden Hunde signifikant höher. Eine NT-proBNP Freisetzung durch VES wurde beim Dobermann bereits nachgewiesen (WESS et al., 2011a). Ansonsten liegen keine weiteren veterinärmedizinischen Daten zum Einfluss ventrikulärer Rhythmusstörungen auf die NT-proBNP-Konzentration vor. Anders hingegen verhält es sich in der Humanmedizin. Bei dilatativer Kardiomyopathie waren steigende NT-proBNP-Spiegel assoziiert mit dem Auftreten ventrikulärer Arrhythmien (SIMON et al., 2008). Durch NT-proBNP Messungen konnte eine Vorhersage über das Wiederauftreten von Vorhofflimmern nach Radiofrequenz-Katheterablation gemacht werden (DEN UIJL et al., 2011). Ebenso konnte bei Patienten, die einen Sinusrhythmus aufwiesen, bei denen aber bereits Vorhofflimmern aufgetreten war, das Risiko eines erneuten Auftretens durch NT-proBNP Messungen bestimmt werden (LATINI et al., 2011). Eine Studie bei Hunden mit Vorhofflimmern hingegen lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Es konnte keine signifikante Erhöhung der NT-proBNP-Konzentration festgestellt werden. Jedoch zeigten Hunde mit Vorhofflimmern verglichen mit herzkranken Hunden im Sinusrhythmus den Trend zu höheren NT-proBNP-Spiegeln (SHIPLEY et al., 2008).

Es wurde nachgewiesen, dass Echoveränderungen respektive eine Volumenüberladung die Hauptursachen für einen NT-proBNP-Konzentrationsanstieg sind (OMLAND & HAGVE, 2009; WESS et al., 2011a). Auffallend sind daher die relativ niedrigen Minimalwerte der Hunde in den Gruppen „Echoveränderungen und VES“ sowie „Echoveränderungen“. Betrachtet man die falsch-negativen Hunde bei einem Cut-Off-Wert von 1100 pmol/l (siehe Tabelle 18) fällt auf, dass mehr als die Hälfte dieser insgesamt 49 falsch-negativen Hunde der Gruppe „Echoveränderungen und VES“ zugeordnet sind. Somit könnte eine mögliche Erklärung sein, dass die Kombination beider Abnormalitäten nicht im gleichen Umfang zu einer NT-proBNP Ausschüttung führt wie das Vorliegen isolierter Echoveränderungen. Bei 15 von 49 Hunden lag der NT-proBNP-Spiegel trotz isolierter echokardiographischer Veränderungen unter dem Cut-Off-Wert von 1100 pmol/l. In einer humanmedizinischen Studie konnten anhand einer NT-proBNP Messung nicht alle Patienten mit systolischer Dysfunktion detektiert werden (DE LEMOS et al., 2009). Eine isolierte

systolische Dysfunktion lag allerdings nur bei einem geringen Teil dieser Hunde vor. Weitere mögliche Einflussfaktoren auf die NT-proBNP-Konzentration werden im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Follow-Up-Studie diskutiert.

Mit zunehmender Schwere der Erkrankung ist ein Anstieg der mittleren NT-proBNP-Konzentration assoziiert. Dieses wurde ebenfalls für Hunde mit Mitralklappenendokardiose nachgewiesen (OYAMA et al., 2008; CHETBOUL et al., 2009; TARNOW et al., 2009). Der Mittelwert der dekompensierten Gruppe beträgt 2849 pmol/l und korreliert mit den Werten anderer Studien (FINE et al., 2008; OYAMA et al., 2008).

Werden die NT-proBNP Maximalwerte der einzelnen Gruppen betrachtet, so fällt auf, dass in den Stadien „ausschließlich VES“, „ausschließlich Echoveränderungen“ sowie „Echoveränderungen und VES“ Maximalwerte von über 3000 pmol/l erreicht werden. Bei einer NT-proBNP-Konzentration in dieser Höhe würde das Vorliegen von kongestivem Herzversagen erwartet werden (FINE et al., 2008; OYAMA et al., 2008; OYAMA et al., 2009). Dementsprechend liegen in der Gruppe der dekompensierten Hunde auch bei 90,9 % der Hunde NT-proBNP-Konzentrationen > 3000 pmol/l vor. Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache könnte in dem maximal messbaren Bereiches des Cardiopet-Tests liegen. Dieser kann eine maximale NT-proBNP-Konzentration von 3030 pmol/l detektieren, Werte die darüber liegen werden als > 3030 pmol/l angegeben. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die dekompensierten Tiere eine höhere NT-proBNP-Konzentration als 3030 pmol/l aufweisen und Konzentrationen in dieser Höhe bei nicht dekompensierten Tieren somit nicht zu hinterfragen sind.

In der Gruppe „ausschließlich VES“ treten bei 9,1 %, in der Gruppe „ausschließlich Echoveränderungen“ bei 20,7 % und in der Gruppe „Echoveränderungen und VES“ bei 41,5 % der Hunde NT-proBNP-Werte > 3000 pmol/l auf. Bei Hunden mit Echoveränderungen können diese extrem hohen Werte durch eine massive Volumenüberladung hervorgerufen werden. Allerdings bleibt damit fraglich, warum bei Hunden, bei denen ausschließlich Rhythmusstörungen vorliegen, so hohe NT-proBNP-Werte festgestellt werden. Beim Menschen wurden erhöhte NT-proBNP respektive BNP-Spiegel beim Auftreten von ventrikulären Arrhythmien nachgewiesen (TADA et al., 2006; OMLAND & HAGVE, 2009). Extrem erhöhte Werte finden sich bei Patienten

mit einem erhöhten Risiko für Sekudentod (GALANTE et al., 2008; SCOTT et al., 2009). Studien bei Hunden, die an Mitralklappenendokardiose erkrankt waren, zeigten, dass die NT-proBNP-Konzentration mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierte und zur Vorhersage des Outcomes geeignet war (CHETBOUL et al., 2009; SERRES et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit für NT-proBNP-Konzentrationen in diesem Bereich wäre das Vorliegen einer pulmonären Hypertension (ATKINSON et al., 2009; KELLIHAN et al., 2011). Da diese Möglichkeit nicht explizit durch weitere Diagnostik untersucht wurde, kann eine pulmonäre Hypertension als potentielle Ursache für hohe NT-proBNP-Werte nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Insgesamt wurde bei 33 Hunden der Gruppen „ausschließlich VES“, „ausschließlich Echoveränderungen“ und „Echoveränderungen und VES“ ein NT-proBNP-Wert > 3000 pmol/l festgestellt. Da insgesamt 137 Hunde in diese drei Gruppen eingeschlossen worden sind, entspricht das einem nicht geringen Anteil von knapp 25 %. Von diesen 33 Hunden starben 14 aufgrund einer kardialen Ursache. Interessanterweise starben zehn Hunde am Sekudentod und nur vier Hunde am kongestiven Herzversagen respektive wurden deshalb euthanasiert. Nach derzeitigem Kenntnisstand wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass mit steigender NT-proBNP-Konzentration das Risiko einer Dekompensation zunimmt. Betrachtet man die Überlebenszeiten, stellt sich heraus, dass von den zehn Hunden, die am Sekudentod starben, sieben Hunde innerhalb von sechs Monaten nach Feststellung des extrem erhöhten NT-proBNP-Wertes gestorben sind. Im gleichen Zeitraum starben zwei Hunde am kongestiven Herzversagen.

Bei 20 Hunden der dekompensierten Gruppe wurden NT-proBNP-Werte > 3000 pmol/l nachgewiesen. Elf Hunde starben insgesamt aufgrund einer kardialen Ursache. In dieser Gruppe starben neun Hunde an den Folgen des kongestiven Herzversagens und zwei am Sekudentod. Die beiden Hunde, bei denen der Sekudentod eintrat, starben innerhalb von sechs Wochen. Mehr als die Hälfte der Hunde mit kongestivem Herzversagen lebte bis zu zwölf Monaten nach der Feststellung des extrem hohen NT-proBNP-Wertes, ein Hund sogar weitere 25 Monate.

Diese Beobachtungen lassen die Annahme zu, dass ein extrem hoher NT-proBNP-Wert, ähnlich wie in der Humanmedizin, mit einem erhöhten Risiko für Sekudentod einhergehen könnte. Das würde bedeuten, dass eine massive NT-

proBNP Freisetzung durch gravierende Rhythmusstörungen isoliert hervorgerufen werden kann, ohne ein gleichzeitiges Auftreten von Echoveränderungen. Dieses würde auch die extrem hohen NT-proBNP-Werte der Hunde, bei denen ausschließlich Rhythmusstörungen aufgetreten sind, erklären. Limitierend muss gesagt werden, dass die Diagnose Sekudentod aufgrund der Berichte der Besitzer gestellt wurde. Lediglich ein Hund kollabierte in der Klinik. Somit liegt bei fast allen Hunden kein EKG zum Todeszeitpunkt vor, welches diese Diagnose bestätigt. Allerdings zeigten Ergebnisse früherer 24-Stunden-EKGs, dass diese Hunde massive Rhythmusstörungen hatten, so dass die Diagnose Sekudentod sehr wahrscheinlich ist. Da die Hunde und damit auch die NT-proBNP-Werte in der Regel in Abständen von drei Monaten kontrolliert wurden, ist eine exakte Aussage über das erstmalige Auftreten eines extrem hohen NT-proBNP-Wertes nicht möglich. Dieses beeinflusst natürlich die Aussage über die Überlebenszeiten. Um die dargestellte Tendenz zu bestätigen, sind allerdings weitere Studien notwendig.

Wie bereits erwähnt, sollte die Fragestellung des jeweiligen Patienten in die Interpretation der Ergebnisse einbezogen werden (OYAMA & SINGLETARY, 2010). In dieser Studie wurden Cut-Off-Werte für den Cardiopet-Test zur Verwendung als Screening-Test zur Unterscheidung zwischen an allen Formen der DoCM erkrankten und gesunden Hunden erstellt. Des Weiteren wurde untersucht, wie sensitiv und spezifisch die bereits bestehenden Cut-Off-Werte, welche für eine anderweitige klinische Fragestellung erstellt worden sind, in diesem Zusammenhang sind.

Wird ein einzelner Wert als Cut-Off-Wert zur Unterscheidung zwischen gesunden und kranken Hunden verwendet, scheint 690 pmol/l ein geeigneter Cut-Off-Wert zu sein. Dieser Wert erreichte eine Sensitivität von 76,5 % und eine Spezifität von 81,6 %. Im Idealfall sollte ein perfekter Screening-Test eine 100-prozentige Sensitivität bei möglichst hoher Spezifität aufweisen. Es sollten möglichst wenige Hunde als falsch-negativ beurteilt werden, da eine Diagnose Auswirkungen auf einen möglichen Zuchteinsatz oder frühzeitige medikamentelle Therapie haben könnte. Falsch-positive Ergebnisse sind ebenso unerwünscht und mit intensiven Kontrollen und damit mit erheblicher finanzieller Belastung des Besitzers verbunden.

Wird ein einzelner Cut-Off-Wert in Höhe von 690 pmol/l verwendet, werden 23,5

% der Untersuchungen als falsch-negativ beurteilt. In 18,4 % der Fälle erfolgt eine falsch-positive Diagnose. Somit ist ein einzelner Wert nur bedingt geeignet. Um die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung besser klassifizieren zu können, wurden mehrere Werte untersucht. Es wurden die Cut-Off-Werte 500 pmol/l und 1100 pmol/l hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität untersucht. Es ließen sich die an einer DoCM erkrankten Hunde bei einem Cut-Off-Wert von 500 pmol/l mit einer Sensitivität von 86,2 % und einer Spezifität von 70,0 % unterscheiden. Bei einem Cut-Off-Wert von 1100 pmol/l lag die Sensitivität bei 62,4 %, die Spezifität bei 92,4 %. Da die echokardiographische Untersuchung erhebliche Kosten verursacht und nur durch einen erfahrenen Untersucher die Diagnose geringgradiger Echoveränderungen überhaupt möglich ist, wäre eine NT-proBNP Bestimmung zur Vorhersage echokardiographischer Veränderungen von großem Interesse. Daher wurden die Cut-Off-Werte hinsichtlich ihrer Eignung zur Vorhersage von Echoveränderungen überprüft. Für Hunde mit echokardiographischen Veränderungen ergibt sich für einen Cut-Off-Wert von 690 pmol/l eine Sensitivität von 93,2 % und eine Spezifität von 81,6 %. Da in diesem Fall eine möglichst hohe Sensitivität erzielt werden sollte, erscheint die Verwendung eines unteren Referenzbereiches von 500 pmol/l allerdings sinnvoller. Für diesen beträgt die Sensitivität 98,9 % und die Spezifität 69,9 %, bei einem Wert von 1100 pmol/l liegt die Sensitivität bei 74,2 % und die Spezifität bei 95,4 %. Somit ist ein NT-proBNP-Wert > 500 pmol/l verdächtig für das Vorliegen von Echoveränderungen, ab 1100 pmol/l sind diese sehr wahrscheinlich.

Da ein einzelner Wert zur Differenzierung von erkrankten und gesunden Tieren sich nur bedingt eignet, wird die Verwendung von Bereichen empfohlen. Die folgenden Referenzbereiche sollten bei Verwendung des Cardiopet-Tests zum Screening auf DoCM eingesetzt werden. Liegt der NT-proBNP-Wert < 500 pmol/l ist das Vorliegen einer Erkrankung unwahrscheinlich. Bei einer NT-proBNP Konzentration zwischen 500 - 1100 pmol/l kann eine Erkrankung nicht ausgeschlossen werden, dieser Bereich wird als Graubereich definiert. Bei einem NT-proBNP-Spiegel > 1100 pmol/l ist das Vorliegen einer Erkrankung sehr wahrscheinlich. Bei einem Wert unter 500 pmol/l erscheint eine Erkrankung unwahrscheinlich. Allerdings werden einige Tiere als falsch-positiv eingestuft. Ebenso kann eine Erkrankung nicht vollständig ausgeschlossen werden, 13,5 %

der erkrankten Tiere werden als falsch-negativ eingestuft. Da echokardiographische Veränderungen jedoch in der Regel mit einem Anstieg der NT-proBNP-Konzentration einhergehen, sollte im Zweifelsfall bei einem grenzwertigen Befund zumindest eine Holteruntersuchung durchgeführt werden. Lediglich 1,1 % der echokardiographischen Veränderungen wurden nicht durch einen NT-proBNP-Konzentrationsanstieg über 500 pmol/l detektiert. Liegt die NT-proBNP-Konzentration zwischen 500 und 1100 pmol/l ist dieses verdächtig für das Vorliegen aller Stadien einer okkulten DoCM und eine kardiologische Abklärung mit Echokardiographie und Holteruntersuchung sollte in jedem Fall durchgeführt werden. Liegt die NT-proBNP-Konzentration > 1100 pmol/l ist das Vorliegen aller okkulten Stadien sehr wahrscheinlich. Bei Verwendung dieses Cut-Off-Wertes werden nur 4,5 % der Untersuchungen als falsch-negativ beurteilt. Prinzipiell ähnliche Resultate hat eine andere Studie unter Verwendung eines anderen Assays ergeben. Für die Unterscheidung aller erkrankten Hunde von den gesunden Dobermännern erzielte ein Cut-Off-Wert von 400 pmol/l eine Sensitivität von 80,1 % und eine Spezifität von 75,0 %. Für Hunde mit echokardiographischen Veränderungen erreichte ein Cut-Off-Wert von 550 pmol/l eine Sensitivität von 78,6 % und eine Spezifität von 90,4 % (WESS et al., 2011a).

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine NT-proBNP-Konzentration > 500 pmol/l nicht gleichbedeutend mit einer DoCM ist. In einer Studie festgestellte wöchentliche NT-proBNP-Konzentrationsschwankungen können ebenfalls eine Ursache für NT-proBNP-Werte oberhalb des festgelegten Cut-Off-Wertes sein (KELLIHAN et al., 2009). Der Vorteil der Verwendung eines niedrigeren Cut-Off-Wertes besteht aber darin, dass weniger okkult erkrankte Hunde verpasst werden. Auch wenn das diagnostische Potential dieses Tests zum Screening aller okkulten Stadien verbesserbar ist, hat die NT-proBNP-Bestimmung ihre Berechtigung. Im Fall der in der „last normal“ Gruppe eingeschlossenen Hunde liefert der Test eine Information, die mit dem herkömmlichen diagnostischen Goldstandard nicht zu bekommen ist. Daher sollte bei kardiologisch gesunden Hunden mit einem Wert über 500 pmol/l eine regelmäßige Kontrolle stattfinden. Sollte die Möglichkeit zur Durchführung einer echokardiographischen Untersuchung nicht vorhanden sein, liefert eine Kombination aus Holter und NT-proBNP Bestimmung aussagekräftige Resultate (MORRIS et al., 2009; WESS et al., 2011a). Grundsätzlich sollte dieser Test jedoch als zusätzliches diagnostisches

Mittel betrachtet werden, wodurch die Möglichkeit besteht, einen frühzeitigen Hinweis auf einen baldigen Erkrankungsbeginn zu bekommen.

Die für den Cardiopet-Test zur Verfügung stehenden Referenzwerte liefern laut Hersteller Informationen zu Hunden mit einem Herzgeräusch und klinischen Symptomen. Diese besagen, dass bei einer NT-proBNP-Konzentration < 800 pmol/l eine Herzinsuffizienz unwahrscheinlich ist. Der Bereich zwischen 800 und 1800 pmol/l wird als Graubereich definiert, Werte über 1800 pmol/l gelten als wahrscheinlich für eine Herzerkrankung die zum kongestiven Herzversagen geführt hat. Würde man diese Werte als Referenzwerte für einen Screening-Test bei der DoCM verwenden, würde sich die Sensitivität und Spezifität wie folgt darstellen. Bei einem Wert von 800 pmol/l ergibt sich eine Sensitivität von 69,2 % und eine Spezifität von 84,7 %, für 1800 pmol/l liegt eine Sensitivität von 37,6 % und eine Spezifität von 100 % vor. Als Screening Parameter für eine okkulte DoCM sind diese Werte ungeeignet. Da Hunde im okkulten Stadium einer DoCM symptomlos sind, sollten die Cut-Off-Werte zum Screening für DoCM in einem deutlich niedrigeren NT-proBNP-Konzentrationsbereich liegen. Interessant ist, dass viele Hunde in dieser Studie eine NT-proBNP-Konzentration von 1800 pmol/l aufweisen und sich nicht im kongestiven Herzversagen befanden. Der Mittelwert der dekompensierten Gruppe in dieser Studie liegt mit 2849 pmol/l deutlich über 1800 pmol/l. In einer Studie von OYAMA und Mitarbeiter (2009) wurden nahezu identische Referenzwerte, wie die für den Cardiopet-Test vorliegenden, auf ihre Sensitivität und Spezifität zur Differenzierung von kardial und respiratorisch bedingter Dyspnoe untersucht. Für eine NT-proBNP-Konzentration von 963 pmol/l wurde eine Sensitivität von 90,3 % und eine Spezifität von 81,3 % angegeben. Bei einem NT-proBNP-Wert in Höhe von 1829 pmol/l lag die Sensitivität bei 64,5 % und die Spezifität bei 91,7 % (OYAMA et al., 2009). Dieses demonstriert, dass die Verwendung von Referenzwerten für die jeweilige Fragestellung notwendig ist, um ein aussagekräftiges Testergebnis zu erhalten.

Als Cut-Off-Wert zur Unterscheidung zwischen gesunden und an allen Formen der DoCM erkrankten Dobermännern wird in einer Studie von WESS und Mitarbeitern (2011) ein Wert von 400 pmol/l angegeben (WESS et al., 2011a). Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Durchführung einer Follow-Up-Studie. Dazu wurden die Hunde nachuntersucht, die in der oben genannten Studie

als gesund eingestuft wurden, aber eine NT-proBNP-Konzentration > 400 pmol/l aufwiesen. Ebenso erfolgte eine Nachuntersuchung erkrankter Hunde deren NT-proBNP-Konzentration unterhalb dieses Cut-Off-Wertes lag. Zur NT-proBNP Bestimmung kam der in der Studie von WESS et al. verwendete Vetsign-Test zum Einsatz, damit sich die Bedingungen möglichst identisch darstellten. Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in seltenen Fällen auch bei gesunden Hunden eine erhöhte NT-proBNP-Konzentration auftritt. In der Humanmedizin sind sowohl bei gesunden Individuen (MELZI D'ERIL et al., 2003), wie auch bei Patienten mit kongestivem Herzversagen Schwankungen der NT-proBNP-Konzentration nachgewiesen worden (WU et al., 2003). Dieses bestätigte sich auch in einer Studie die die wöchentliche Variabilität der NT-proBNP-Konzentration bei gesunden Hunden untersuchte. In dieser Studie wurden bei gesunden Hunden teilweise mehrfach NT-proBNP-Konzentrationen > 500 pmol/l nachgewiesen (KELLIHAN et al., 2009). Betrachtet man den Verlauf der NT-proBNP-Werte beider Gruppen dieser Follow-Up-Studie erscheinen Konzentrationsschwankungen eine plausible Erklärung dafür zu sein. Da aber jede Erhöhung der NT-proBNP-Konzentration > 500 pmol/l mit einem baldigen Erkrankungsbeginn verbunden sein könnte, sollten diese Hunde regelmäßig kontrolliert werden.

Weiterhin könnten extrakardiale Ursachen bei den Hunden der gesunden Gruppe zur Erhöhung der NT-proBNP-Konzentration geführt haben. Bisher existieren zu extrakardialen Ursachen für einen NT-proBNP Anstieg lediglich zwei veterinärmedizinische Studien, die nachweisen, dass bei azotämischen Hunden die NT-proBNP-Konzentration erhöht ist (RAFFAN et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009). Jedoch wurde der Einfluss extrakardialer Ursachen auf die Konzentration von c-terminalem BNP nachgewiesen. Hunde, die an traumatischen, neurologischen, neoplastischen oder gastrointestinalen Erkrankungen litten, wiesen höhere BNP Konzentrationen auf als gesunde Hunde (LEE et al., 2011). Zwar können absolute Werte beider B-Typ natriuretischen Peptide nicht miteinander verglichen werden, jedoch liefern beide identische Informationen (REHMAN & JANUZZI, 2008; LEE et al., 2011). Ebenso führt eine pulmonäre Hypertension zum Anstieg der NT-proBNP-Werte beim Hund (FARACE, 2009; KELLIHAN et al., 2011). Konnte im Rahmen der echokardiographischen Untersuchung in dieser Studie eine Trikuspidalinsuffizienz oder eine

Pulmonalinsuffizienz festgestellt werden, wurde durch die Messung der Geschwindigkeit des Insuffizienzjets eine indirekte Druckberechnung zur Diagnose einer möglichen pulmonären Hypertension durchgeführt. Hunde mit pulmonärer Hypertension, die nicht indirekt über den Ultraschall festgestellt werden konnte, blieben allerdings unerkannt. Hunde mit weiteren systemischen Erkrankungen wurden ausgeschlossen, wenn diese im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen aufgefallen sind oder der Besitzer davon berichtet hat. Eine direkte Untersuchung auf Neoplasien, traumatische, neurologische und gastrointestinale Erkrankungen, die zum Anstieg der NT-proBNP-Konzentration führen können (LEE et al., 2011) fand nicht statt. Da nachgewiesen worden ist, dass eine Azotämie zu erhöhten NT-proBNP-Spiegeln führt (RAFFAN et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009), wurde zum Ausschluss einer Azotämie Harnstoff und Kreatinin der Hunde bestimmt, so dass dieses als potentielle Ursache für hohe NT-proBNP-Werte gesunder Hunde ausgeschlossen werden kann.

Der zweite Teil der Follow-Up-Studie bestand darin, erkrankte Hunde deren NT-proBNP-Konzentration < 400 pmol/l lag, erneut zu untersuchen und den weiteren Verlauf der NT-proBNP-Konzentration zu betrachten. Auffällig ist, dass ein Großteil der erkrankten Hunde mit einem NT-proBNP-Wert < 400 pmol/l lediglich Rhythmusstörungen aufweist. In zwei Studien wurde bereits nachgewiesen, dass NT-proBNP besser geeignet ist zur Vorhersage von echokardiographischen Veränderungen als zur Vorhersage von Rhythmusstörungen (MORRIS et al., 2009; WESS et al., 2011a). Dieses ist auch hier als Ursache für den niedrigen NT-proBNP-Wert anzunehmen. Interessant wäre herauszufinden, ob auch bei dekompensierten Patienten der NT-proBNP-Spiegel solchen Schwankungen unterliegt. Dieses ist in der Humanmedizin beschrieben (WU et al., 2003). Da beide Tests allerdings Werte über 3030 pmol/l nicht nachweisen können, konnte dieses in vorliegender Studie nicht beurteilt werden. Weiterhin würde die Möglichkeit einer reduzierten NT-proBNP Produktion als Ursache für die niedrigen NT-proBNP-Werte der erkrankten Hunde in Frage kommen. Pro-BNP wird durch die Protease Corin in aktives c-terminales BNP und inaktives NT-proBNP gespalten. In einer Studie an Menschen und Mäusen wurde nachgewiesen, dass eine reduzierte Corin Aktivität die Aufspaltung von proBNP behindert und bei Menschen im Herzversagen zur Verschlechterung der kardialen Funktion beiträgt (CHEN et al., 2010). Ebenso

könnte ein erhöhter Abbau des NT-proBNPs für niedrige Werte verantwortlich sein. Die Aktivität der NEP, die zum Abbau natriuretischer Peptide führt, wird durch endogene Substanzen wie Glukokortikoide, Thrombin, Calcitonin und Zytokine, gesteigert. Allerdings ist die Affinität der B-Typ-natriuretischen Peptide zur NEP relativ gering (ROQUES et al., 1993). Veterinärmedizinische Studien zu diesem Thema liegen nicht vor. Eine aktuelle Studie hat den Einfluss der Gabe des β -Blockers Atenolol auf die NT-proBNP-Konzentration von Katzen mit schwerer HCM evaluiert. Dabei wurde festgestellt, dass die NT-proBNP-Konzentration durch die Gabe von Atenolol nicht reduziert wurde (JUNG & KITTLESON, 2011). Da einige der erkrankten Hunde in dieser Studie ebenfalls β -Blocker erhielten, erscheint dieses keine potentielle Ursache für eine reduzierte NT-proBNP-Konzentration erkrankter Hunde zu sein.

Die Einteilung in die gesunde Kontrollgruppe und die verschiedenen Erkrankungsstadien erfolgte durch das Ergebnis der Holteruntersuchung, der Befunde der klinischen Untersuchung und des Herzultraschalls. Dieses ist momentan der Goldstandard zur Diagnose der okkulten DoCM (CALVERT et al., 2000a; CALVERT et al., 2000b; MEURS et al., 2001; CALVERT & MEURS, 2009). Das Vorliegen echokardiographischer Veränderungen wurde anhand der mittels SSSM bestimmten linksventrikulären Volumina beurteilt. Als pathologisch wurde ein enddiastolisches Volumen $> 100 \text{ ml/m}^2$ Körperoberfläche oder ein endsystolisches Volumen $> 55 \text{ ml/m}^2$ Körperoberfläche eingestuft (SIMAK, 2008). Es hat sich herausgestellt, dass die Verwendung der SSSM mit diesen Cut-Off-Werten der Verwendung des M-Modus zum Nachweis frühzeitig auftretender Echoveränderungen überlegen ist (WESS et al., 2010c). Daher wurden die Hunde in dieser Studie als echoverändert klassifiziert, wenn einer der beiden Parameter abnormal war.

Die gesunde Kontrollgruppe bestand aus Hunden, die älter als fünf Jahre sein mussten. Damit sollte das Risiko minimiert werden, dass Hunde eingeschlossen wurden, die im Laufe ihres Lebens noch erkranken. Somit konnte der Einfluss des Alters auf die NT-proBNP-Konzentration nur für zwei Altersgruppen bestimmt werden und hat nur begrenzte Aussagekraft. Es stellte sich ein signifikanter Unterschied des NT-proBNP-Wertes für Hunde über acht Jahre im Vergleich zu Hunden zwischen fünf und acht Jahren dar. Der Einfluss des Alters auf die NT-proBNP-Konzentration wird in der Tiermedizin kontrovers diskutiert. In den

meisten Studien wurde kein Einfluss des Alters auf die NT-proBNP-Konzentration nachgewiesen (BOSWOOD et al., 2008; OYAMA et al., 2008; FOX et al., 2009; TARNOW et al., 2009). Lediglich in einer Studie bei Katzen wurden signifikant höhere NT-proBNP-Werte bei älteren Katzen festgestellt (LALOR et al., 2009). Ebenso wurden in einer Studie von WESS und Mitarbeitern (2011) höhere NT-proBNP-Werte bei älteren Dobermännern festgestellt, jedoch wurde dort eine ähnliche Studienpopulation wie in dieser Studie verwendet (WESS et al., 2011a).

Eine Limitation dieser Studie besteht darin, dass die Hunde der gesunden Gruppe nicht bis an ihr Lebensende verfolgt worden sind. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in diese Gruppe Hunde eingeschlossen worden sind, die einen Myokardschaden auf zellulärer Ebene aufweisen. Dieser ist mit dem derzeitigen diagnostischen Goldstandard bestehend aus Echokardiographie und Holter nicht nachweisbar. Somit könnte der NT-proBNP Mittelwert der Kontrollgruppe durch Hunde, die als falsch-negativ beurteilt worden sind und eventuell einen höheren NT-proBNP-Wert aufweisen, beeinflusst worden sein. Eine weitere Limitation besteht darin, dass die Testdurchführung unter verschiedenen Bedingungen stattgefunden hat. Der Cardiopet-Test wurde unter standardisierten Bedingungen in einem professionellen Labor durchgeführt. Der Vetsign-Test wurde, zwar unter absoluter Einhaltung der Bedienungsanleitung, von Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik im Kliniklabor durchgeführt. Dadurch kann eine Beeinflussung der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Die NT-proBNP-Werte verschiedener Assays sind nicht miteinander vergleichbar. Folgende Referenzbereiche werden zur Interpretation der Cardiopet-Test Ergebnisse bei Verwendung als Screening-Test zur DoCM empfohlen. Bei einer NT-proBNP-Konzentration < 500 pmol/l ist eine Erkrankung unwahrscheinlich, der Konzentrationsbereich zwischen $500 - 1100$ pmol/l wird als Graubereich definiert, in dem eine Erkrankung nicht ausgeschlossen werden kann. Liegt die NT-proBNP-Konzentration über 1100 pmol/l ist das Vorliegen einer Erkrankung sehr wahrscheinlich. Um die Verwendung des Tests und damit seine Aussagekraft zu optimieren, sollten einheitliche Bedingungen für das Probenhandling geschaffen werden. Zurzeit stellen Protease Inhibitor enthaltene Stabilisatorröhrchen keine adäquate Alternative zum Versand der gefrorenen Proben dar. Weiterhin sollte evaluiert werden, ob anhand extrem hoher NT-

proBNP-Werte, bei nicht dekompensierten Hunden, eine Aussage über das Risiko des Sekudentodes respektive der Überlebenszeit getroffen werden kann.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die dilatative Kardiomyopathie ist die häufigste kardiale Todesursache bei Dobermännern (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Der diagnostische Goldstandard, bestehend aus Holter und Echokardiographie, ist eine aufwendige und kostenintensive Methode, die nicht überall zur Verfügung steht. Die NT-proBNP Bestimmung liefert insbesondere zur Vorhersage echokardiographischer Veränderungen aussagekräftige Resultate (MORRIS et al., 2009; WESS et al., 2011a). Erschwert wird die Anwendung dieses Tests durch unterschiedliches Probenhandling, die Verwendung unterschiedlicher Assays und die fragliche Übertragbarkeit von Referenzwerten auf Ergebnisse verschiedener Tests und klinischer Fragestellungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit **NT-proBNP bei der Dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns: Erstellung von Referenzwerten und Durchführung eines Testvergleichs sowie einer Follow-Up-Studie** war die Erstellung von NT-proBNP Referenzwerten für einen neuen Test zur Verwendung als Screening-Test beim Dobermann, sowie der Vergleich der Resultate dieses neuen Tests mit einem bisher verwendeten. Ein weiteres Ziel war die Evaluierung der NT-proBNP Stabilität in Protease-Inhibitor enthaltenden Probenröhrchen. Außerdem wurde eine Follow-Up-Studie durchgeführt. Darin wurden Hunde eingeschlossen, die in einer vorherigen Studie gesund waren und eine NT-proBNP-Konzentration oberhalb des in dieser Studie festgestellten Cut-Off-Wertes von 400 pmol/l aufwiesen, respektive erkrankte Hunde, deren NT-proBNP-Spiegel unterhalb dieses Cut-Off-Wertes lag.

Dazu wurden insgesamt zwischen 2004 und 2011 623 Untersuchungen an 168 gesunden und 159 kranken Hunden vorgenommen. Es erfolgte eine Einteilung der Hunde in die Gruppen „gesund“, „ausschließlich ventrikuläre Extrasystolen“, „ausschließlich Echoveränderungen“, „Echoveränderungen und ventrikuläre Extrasystolen“, „dekompensiert“ und „last normal“. Zur Erstellung der Cut-Off-Werte wurden 196 Untersuchungen von 125 gesunden Hunden, die älter als fünf Jahre waren, verwendet. Das Vorliegen aller Stadien einer Dobermann Kardiomyopathie ist bei einer NT-proBNP-Konzentration < 500 pmol/l unwahrscheinlich. Ein NT-proBNP-Spiegel zwischen 500 - 1100 pmol/l wird als

Graubereich definiert und ist verdächtig für das Vorliegen einer Dobermann Kardiomyopathie. Wird ein NT-proBNP-Wert > 1100 pmol/l festgestellt ist der Hund mit sehr großer Wahrscheinlichkeit erkrankt. Es wird empfohlen, diese Referenzwerte zur Interpretation der Cardiopet-Testergebnisse bei der Anwendung als Screening-Test auf Dobermann Kardiomyopathie zu verwenden. Die für den Test bestehenden Referenzwerte des Herstellers, welche für eine andere klinische Fragestellung entwickelt wurden, liefern als Screening Parameter für die Dobermann Kardiomyopathie keine aussagekräftigen Resultate. Echoveränderungen sind bei einem Wert von > 1100 pmol/l sehr wahrscheinlich. Jeder Anstieg der NT-proBNP-Konzentration über 500 pmol/l könnte mit einer Dobermann Kardiomyopathie assoziiert sein, daher sollte ein Holter und eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt werden. Sollte eine Ultraschalluntersuchung nicht durchführbar sein, könnte diese durch die NT-proBNP Messung ersetzt werden. Zwischen fast allen Erkrankungsstadien waren statistisch signifikante Konzentrationsunterschiede nachweisbar. Ebenso wurden bei der „last normal“ Gruppe signifikant höhere NT-proBNP-Werte nachgewiesen als bei den gesunden Hunden. Die Biomarker Bestimmung scheint in diesem frühen Erkrankungsstadium der herkömmlichen Diagnostik überlegen. Interessant sind die extrem hohen NT-proBNP-Werte, der Hunde, die nicht dekompenziert sind. Werden die Überlebenszeiten betrachtet, stellt sich heraus, dass von den zehn Hunden die am Sekudentod starben, sieben innerhalb von sechs Monaten nach Feststellung der extrem erhöhten NT-proBNP-Konzentration gestorben sind. Somit scheint eine prognostische Aussage durch Bestimmung der NT-proBNP Konzentration möglich zu sein. Um diese Tendenz zu bestätigen, bedarf es allerdings der Durchführung weiterer Studien.

Die Follow-Up-Studie zeigte, dass auch gesunde Hunde in seltenen Fällen eine erhöhte NT-proBNP-Konzentration aufwiesen. Um sicherzustellen, dass es sich dabei nicht um die „last normal“ Untersuchung handelt, sollte eine regelmäßige Kontrolle erfolgen.

Die Ergebnisse der zwei in dieser Studie verwendeten Assays sind nicht miteinander vergleichbar, ein Faktor zur Umrechnung konnte nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die NT-proBNP-Konzentration im Protease-Inhibitor enthaltenden Stabilisatorröhrchen statistisch signifikant niedriger ist als in der bis zur Testdurchführung gefrorenen Probe. Die Funktion

des Protease-Inhibitors ist somit unzureichend. Daher wird empfohlen, die Proben weiterhin gefroren zu versenden um aussagekräftige Resultate zu erhalten.

VII. SUMMARY

Dilated cardiomyopathy is the most common cause for cardiac death in Doberman Pinschers (O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Echocardiography and holter examinations are considered to be the diagnostic gold standards. But these methods are comparatively time consuming and therefore expensive and of limited availability. NT-proBNP is especially for the prediction of echocardiographic changes a useful test (MORRIS et al., 2009; WESS et al., 2011a). The lack of standardized guidelines for sample handling and the use of different types of NT-proBNP assays makes the comparison of results difficult. Furthermore it is debatable whether the same cut-off values could be used for answering different clinical questions.

The aim of this study **NT-proBNP in dilated cardiomyopathy of Doberman Pinschers: Development of cut-off values, comparison of two different assays and performance of a follow-up study** was the development of cut-off values for a new NT-proBNP assay, used as a screening test for occult dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. Additionally the results of the new test were compared to those of another established NT-proBNP test. Another purpose of this study was the evaluation of the stability of NT-proBNP in a special sampling tube containing a protease inhibitor. Furthermore, a follow-up study was performed. Dogs of a prior study, which were considered to be healthy according to echocardiography and holter examination, but yet had a NT-proBNP concentration above the established cut-off value (> 400 pmol/l) were re-examined several times to evaluate the further outcome of these dogs. Additionally, dogs in the occult phase of the disease, which had a NT-proBNP concentration less than 400 pmol/l were included in the follow-up study.

A total of 623 examinations of 168 healthy and 159 dogs with diagnosed cardiomyopathy were performed. The dogs were classified according to echocardiographic and holter examination results into one of the following groups: "healthy", "only ventricular premature complexes", "only Echo", "Echo and ventricular premature complexes", "decompensated" and "last normal". For the calculation of cut-off values only dogs older than five years were included in the control group. A total of 196 examinations of these 125 healthy dogs were

included. The present study shows that a cut-off value of 500 pmol/l for NT-proBNP is a good screening parameter for Doberman cardiomyopathy. It is very unlikely that a Doberman Pinscher with a NT-proBNP concentration of < 500 pmol/l suffers from any stage of Doberman cardiomyopathy. A NT-proBNP concentration between 500 - 1100 pmol/l is defined as grey zone and associated with an increased risk of being affected. NT-proBNP values higher than 1100 pmol/l are quite specific to predict Doberman cardiomyopathy. It is important to notice that the present study established screening cut-off values to test for occult Doberman cardiomyopathy using the Cardiopet-test. The currently by Idexx promoted cut-off values for the Cardiopet-test are much higher than the cut-off values established here, but they are used to predict congestive heart failure and they are not used as a screening test for occult disease. A cut-off value of > 1100 pmol/l is very specific to predict echocardiographic changes in Doberman Pinschers. Any elevation of the NT-proBNP concentration above 500 pmol/l could be associated with Doberman cardiomyopathy, so dogs having values above this cut-off value should be examined using echocardiography and a holter recording. If echocardiography is not available it may be replaced by measurement of NT-proBNP. Performing a holter analysis is absolutely necessary because sensitivity is too low to detect rhythm disturbances.

Comparing all stages of the disease, significant differences in the NT-proBNP concentration were detected between all diseases groups. Similarly to a prior study using another assay it was shown that the NT-proBNP concentration in the „last normal“ group was significantly higher than in the healthy control group. Measuring this biomarker seems to be superior to the so called diagnostic gold standard in this early stage of the disease. Furthermore, some dogs in the occult phase had very high NT-proBNP results (> 3000 pmol/l), values that are usually only seen in the decompensated disease stage. A closer look on the survival times of these dogs shows that seven of these ten dogs died because of sudden death within six months after measuring the high NT-proBNP values. This indicates that very high NT-proBNP values might indicate an increased risk to die suddenly. Further studies are needed to proof these interesting initial results.

The results of the follow-up study showed that healthy dogs can occasionally have slightly increased NT-proBNP concentration. To ensure that this is not the “last normal” examination these dogs should be reexamined more frequently.

The results of the two assays used in this study are not comparable. A factor for conversion of the results could not be established and separate cut-off values should be used for these two different NT-proBNP tests. In addition it was shown that the NT-proBNP concentration is significantly lower using the sample tube containing the protease inhibitor than in the frozen plasma sample. Thus, using this stabilisator sample tubes is not an alternative for freezing. It is recommended that the samples should be shipped frozen to the laboratory if possible.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abell TJ, Richards AM, Ikram H, Espiner EA, Yandle T. Atrial natriuretic factor inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 1392-6.

Abraham WT, Lowes BD, Ferguson DA, Odom J, Kim JK, Robertson AD, Bristow MR, Schrier RW. Systemic hemodynamic, neurohormonal, and renal effects of a steady-state infusion of human brain natriuretic peptide in patients with hemodynamically decompensated heart failure. *J Card Fail* 1998; 4: 37-44.

Abraham WT, Trupp RJ, Jarjoura D. Nesiritide in acute decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *Clin Cardiol* 2010; 33: 484-9.

Achen S, Gordon SG, Roland R, Saunders A, Bogess M, Miller M. Serial evaluation of NT-proBNP in dogs with CHF predicts clinical score and the presence and absence of radiographic pulmonary edema. *Journal Of Veterinary Internal Medicine (Abstract)* 2009; 23: 687.

Alonso-Martinez JL, Urbieta-Echezarreta M, Anniccherico-Sanchez FJ, Abinzano-Guillen ML, Garcia-Sanchotena JL. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide predicts the burden of pulmonary embolism. *Am J Med Sci* 2009; 337: 88-92.

ANONYMUS. Intravenous nesiritide vs nitroglycerin for treatment of decompensated congestive heart failure: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 287: 1531-40.

Aramaki Y, Chimura S, Hori Y, Eguchi T. Therapeutic Changes of Plasma N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide Concentrations in 9 Dogs with Patent Ductus Arteriosus. *J Vet Med Sci* 2010;

Asano K, Masuda K, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Plasma atrial and

brain natriuretic peptide levels in dogs with congestive heart failure. *J Vet Med Sci* 1999; 61: 523-9.

Atkinson KJ, Fine DM, Thombs LA, Gorelick JJ, Durham HE. Evaluation of pimobendan and N-terminal probrain natriuretic peptide in the treatment of pulmonary hypertension secondary to degenerative mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1190-6.

Auerbach SR, Richmond ME, Lamour JM, Blume ED, Addonizio LJ, Shaddy RE, Mahony L, Pahl E, Hsu DT. BNP levels predict outcome in pediatric heart failure patients: post hoc analysis of the Pediatric Carvedilol Trial. *Circ Heart Fail* 2010; 3: 606-11.

Baumwart RD, Meurs KM. Assessment of plasma brain natriuretic peptide concentration in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2005; 66: 2086-9.

Beilby J. National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) laboratory medicine guidelines on the clinical utilization and analytical issues for cardiac biomarker testing in heart failure. *Clin Biochem Rev* 2008; 29: 107-11.

Biondo AW, Ehrhart EJ, Sisson DD, Bulmer BJ, De Morais HS, Solter PF. Immunohistochemistry of atrial and brain natriuretic peptides in control cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Vet Pathol* 2003; 40: 501-6.

Boomsma F, van den Meiracker AH. Plasma A- and B-type natriuretic peptides: physiology, methodology and clinical use. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 442-9.

Boswood A, Dukes-McEwan J, Loureiro J, James RA, Martin M, Stafford-Johnson M, Smith P, Little C, Attree S. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *J Small Anim Pract* 2008; 49: 26-32.

Brown A, George J, Murphy MJ, Struthers A. Could BNP screening of acute chest pain cases lead to safe earlier discharge of patients with non-cardiac causes? A pilot study. *QJM* 2007; 100: 755-61.

Bruins S, Fokkema MR, Romer JW, Dejongste MJ, van der Dijs FP, van den Ouweland JM, Muskiet FA. High intraindividual variation of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with stable chronic heart failure. *Clin Chem* 2004; 50: 2052-8.

Brunner-La Rocca HP, Weilenmann D, Kiowski W, Maly FE, Candinas R, Follath F. Within-patient comparison of effects of different dosages of enalapril on functional capacity and neurohormone levels in patients with chronic heart failure. *Am Heart J* 1999; 138: 654-62.

Calvert CA, Chapman WL, Jr., Toal RL. Congestive cardiomyopathy in Doberman pinscher dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 181: 598-602.

Calvert CA, Brown J. Use of M-mode echocardiography in the diagnosis of congestive cardiomyopathy in Doberman pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189: 293-7.

Calvert CA. Diagnosis and management of ventricular tachyarrhythmias in Doberman pinschers with cardiomyopathy. In: *Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice*. Kirk RW, Bonagura JD, eds. Toronto: W. B. Saunders 1995: 799-806.

Calvert CA, Pickus CW, Jacobs GJ, Brown J. Signalment, survival, and prognostic factors in Doberman pinschers with end-stage cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 1997a; 11: 323-6.

Calvert CA, Hall G, Jacobs G, Pickus C. Clinical and pathologic findings in Doberman pinschers with occult cardiomyopathy that died suddenly or developed congestive heart failure: 54 cases (1984-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1997b; 210: 505-11.

Calvert CA, Jacobs GJ, Kraus M. Possible ventricular late potentials in Doberman pinschers with occult cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 1998a; 213: 235-9.

Calvert CA, Jacobs GJ, Kraus M, Brown J. Signal-averaged electrocardiograms in normal Doberman pinschers. *J Vet Intern Med* 1998b; 12: 355-64.

Calvert CA, Jacobs GJ. Heart rate variability in Doberman Pinschers with and without echocardiographic evidence of dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2000; 61: 506-11.

Calvert CA, Jacobs G, Pickus CW, Smith DD. Results of ambulatory electrocardiography in overtly healthy Doberman Pinschers with echocardiographic abnormalities. *J Am Vet Med Assoc* 2000a; 217: 1328-32.

Calvert CA, Jacobs GJ, Smith DD, Rathbun SL, Pickus CW. Association between results of ambulatory electrocardiography and development of cardiomyopathy during long-term follow-up of Doberman pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 2000b; 216: 34-9.

Calvert CA, Meurs KM. CVT Update: Doberman Pinscher occult cardiomyopathy. In: *Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice*. Kirk RW, Bonagura JD, eds.: W. B. Saunders 2000: 756-60.

Calvert CA, Wall TM. Correlations among time and frequency measures of heart rate variability recorded by use of a Holter monitor in overtly healthy Doberman pinschers with and without echocardiographic evidence of dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2001; 62: 1787-92.

Calvert CA, Brown J. Influence of antiarrhythmia therapy on survival times of 19 clinically healthy Doberman pinschers with dilated cardiomyopathy that experienced syncope, ventricular tachycardia, and sudden death (1985-1998). *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40: 24-8.

Calvert CA, Meurs KM. Cardiomyopathy in Doberman Pinschers. In: Current Veterinary Therapy XIV. Kirk RW, Bonagura JD, eds.: 2009:

Cameron VA, Rademaker MT, Ellmers LJ, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Atrial (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) expression after myocardial infarction in sheep: ANP is synthesized by fibroblasts infiltrating the infarct. *Endocrinology* 2000; 141: 4690-7.

Casserly BP, Sears EH, Gartman EJ. The role of natriuretic peptides in inflammation and immunity. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2010; 4: 90-104.

Castelli G, Ciaccheri M, Cecchi F, Troiani V, Nannini M, Marconi P, Olivotto J, Monterecci A, Dolara A. Nonsustained ventricular tachycardia as a predictor for sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. The role of amiodarone treatment. *G Ital Cardiol* 1999; 29: 514-23.

Cauliez B, Guignery J, Marinier S, Mariau I, Lavoigne A. Two-year stability of NT-proBNP in frozen samples using the Roche Elecsys system. *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 318-9.

Chen HH, Lainchbury JG, Burnett JC, Jr. Natriuretic peptide receptors and neutral endopeptidase in mediating the renal actions of a new therapeutic synthetic natriuretic peptide dendroaspis natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1186-91.

Chen S, Sen S, Young D, Wang W, Moravec CS, Wu Q. Protease corin expression and activity in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299: H1687-92.

Chetboul V, Tessier-Vetzel D, Escriou C, Tissier R, Carlos C, Boussouf M, Pouchelon JL, Blot S, Derumeaux G. Diagnostic potential of natriuretic peptides in the occult phase of golden retriever muscular dystrophy cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 845-50.

Chetboul V, Serres F, Tissier R, Lefebvre HP, Sampedrano CC, Gouni V, Poujol L, Hawa G, Pouchelon JL. Association of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration with mitral regurgitation severity and outcome in dogs with asymptomatic degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 984-94.

Cheung BM. Plasma concentration of brain natriuretic peptide is related to diastolic function in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24: 966-8.

Chung T, Sindone A, Foo F, Dwyer A, Paoloni R, Janu MR, Wong H, Hall J, Freedman SB. Influence of history of heart failure on diagnostic performance and utility of B-type natriuretic peptide testing for acute dyspnea in the emergency department. *Am Heart J* 2006; 152: 949-55.

Ciuraszkiewicz K, Janion M, Sielski J, Dudek D, Gawor Z. Post-myocardial infarction intraventricular conduction defects and B-type natriuretic peptide levels. *Clin Cardiol* 2009; 32: E12-7.

Clarkson PB, Wheeldon NM, MacFadyen RJ, Pringle SD, MacDonald TM. Effects of brain natriuretic peptide on exercise hemodynamics and neurohormones in isolated diastolic heart failure. *Circulation* 1996; 93: 2037-42.

Collins SA, Patteson MW, Connolly DJ, Brodbelt DC, Torrance AG, Harris JD. Effects of sample handling on serum N-terminal proB-type natriuretic peptide concentration in normal dogs and dogs with heart disease. *J Vet Cardiol* 2010; 12: 41-8.

Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, Abraham WT, Bourge RC, Johnson AD, Wagoner LE, Givertz MM, Liang CS, Neibaur M, Haught WH, LeJemtel TH. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 246-53.

Connolly DJ, Magalhaes RJ, Syme HM, Boswood A, Fuentes VL, Chu L, Metcalf

M. Circulating natriuretic peptides in cats with heart disease. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 96-105.

Connolly DJ, Brodbelt DC, Copeland H, Collins S, Fuentes VL. Assessment of the diagnostic accuracy of circulating cardiac troponin I concentration to distinguish between cats with cardiac and non-cardiac causes of respiratory distress. *J Vet Cardiol* 2009a; 11: 71-8.

Connolly DJ, Soares Magalhaes RJ, Fuentes VL, Boswood A, Cole G, Boag A, Syme HM. Assessment of the diagnostic accuracy of circulating natriuretic peptide concentrations to distinguish between cats with cardiac and non-cardiac causes of respiratory distress. *J Vet Cardiol* 2009b; 11 Suppl 1: S41-50.

Connolly DJ, Hezzell MJ, Fuentes VL, Chang YM, Swan R, Syme HM. The effect of protease inhibition on the temporal stability of NT-proBNP in feline plasma at room temperature. *J Vet Cardiol* 2011a;

Connolly DJ, Hezzell MJ, Fuentes VL, Chang YM, Swan R, Syme HM. The effect of protease inhibition on the temporal stability of NT-proBNP in feline plasma at room temperature. *J Vet Cardiol* 2011b; 13: 13-9.

D'Souza SP, Davis M, Baxter GF. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol Ther* 2004; 101: 113-29.

Dambach DM, Lannon A, Sleeper MM, Buchanan J. Familial dilated cardiomyopathy of young Portuguese water dogs. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 65-71.

Daniels LB, Clopton P, Bhalla V, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA, Maisel AS. How obesity affects the cut-points for B-type natriuretic peptide in the diagnosis of acute heart failure. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am Heart J* 2006; 151: 999-1005.

Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2357-68.

Das SR, Drazner MH, Dries DL, Vega GL, Stanek HG, Abdullah SM, Canham RM, Chung AK, Leonard D, Wians FH, Jr., de Lemos JA. Impact of body mass and body composition on circulating levels of natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study. *Circulation* 2005; 112: 2163-8.

Davutoglu V, Gunay N, Kocoglu H, Gunay NE, Yildirim C, Cavdar M, Tarakcioglu M. Serum levels of NT-ProBNP as an early cardiac marker of carbon monoxide poisoning. *Inhal Toxicol* 2006; 18: 155-8.

de Bold AJ. Cardiac natriuretic peptides gene expression and secretion in inflammation. *J Investig Med* 2009; 57: 29-32.

de Lemos JA, McGuire DK, Khera A, Das SR, Murphy SA, Omland T, Drazner MH. Screening the population for left ventricular hypertrophy and left ventricular systolic dysfunction using natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study. *Am Heart J* 2009; 157: 746-53 e2.

DeFrancesco TC, Rush JE, Rozanski EA, Hansen BD, Keene BW, Moore DT, Atkins CE. Prospective clinical evaluation of an ELISA B-type natriuretic peptide assay in the diagnosis of congestive heart failure in dogs presenting with cough or dyspnea. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 243-50.

den Uijl DW, Delgado V, Tops LF, Ng AC, Boersma E, Trines SA, Zeppenfeld K, Schalij MJ, van der Laarse A, Bax JJ. Natriuretic peptide levels predict recurrence of atrial fibrillation after radiofrequency catheter ablation. *Am Heart J* 2011; 161: 197-203.

Detaint D, Messika-Zeitoun D, Avierinos JF, Scott C, Chen H, Burnett JC, Jr., Enriquez-Sarano M. B-type natriuretic peptide in organic mitral regurgitation: determinants and impact on outcome. *Circulation* 2005; 111: 2391-7.

Detaint D, Messika-Zeitoun D, Chen HH, Rossi A, Avierinos JF, Scott C, Burnett JC, Jr., Enriquez-Sarano M. Association of B-type natriuretic peptide activation to left ventricular end-systolic remodeling in organic and functional mitral regurgitation. *Am J Cardiol* 2006; 97: 1029-34.

Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, Glasziou P. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *BMJ* 2005; 330: 625.

Downie PF, Talwar S, Squire IB, Davies JE, Barnett DB, Ng LL. Assessment of the stability of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in vitro: implications for assessment of left ventricular dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 1999; 97: 255-8.

Dussaule JC, Stefanski A, Bea ML, Ronco P, Ardaillou R. Characterization of neutral endopeptidase in vascular smooth muscle cells of rabbit renal cortex. *Am J Physiol* 1993; 264: F45-52.

Eliasdottir SB, Klemenzson G, Torfason B, Valsson F. Brain natriuretic peptide is a good predictor for outcome in cardiac surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52: 182-7.

Espinera EA, Richards AM, Yandle TG, Nicholls MG. Natriuretic hormones. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995; 24: 481-509.

Eurlings LW, van Pol PE, Kok WE, van Wijk S, Lodewijks-van der Bolt C, Balk AH, Lok DJ, Crijns HJ, van Kraaij DJ, de Jonge N, Meeder JG, Prins M, Pinto YM. Management of Chronic Heart Failure Guided by Individual N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Targets Results of the PRIMA (Can PRO-brain-natriuretic peptide guided therapy of chronic heart failure IMPROVE heart failure morbidity and mortality?) Study. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 2090-100.

Farace G, Beardow A, Carpenter C, Yeung K, Zieba M, Ettinger S, Forney S. Effect of Shipping Temperature on Canine N-Terminal Prohormone Atrial Natriuretic Peptide & N-Terminal Prohormone Brain natriuretic Peptide. *Journal*

Of Veterinary Internal Medicine (Abstract) 2008; 22: 759.

Farace G. Pulmonary Hypertension And N-Terminal Pro Hormone Brain Natriuretic Peptide In Dogs. Journal Of Veterinary Internal Medicine (Abstract) 2009; 23: 687.

Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* 2002; 82: 945-80.

Federico C. Natriuretic Peptide system and cardiovascular disease. *Heart Views* 2010; 11: 10-5.

Felker GM, Hasselblad V, Hernandez AF, O'Connor CM. Biomarker-guided therapy in chronic heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2009; 158: 422-30.

Fine DM, DeClue AE, Reiner CR. Evaluation of circulating amino terminal-pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 1674-9.

Forfia PR, Watkins SP, Rame JE, Stewart KJ, Shapiro EP. Relationship between B-type natriuretic peptides and pulmonary capillary wedge pressure in the intensive care unit. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1667-71.

Fox PR, Oyama MA, Reynolds C, Rush JE, DeFrancesco TC, Keene BW, Atkins CE, Macdonald KA, Schober KE, Bonagura JD, Stepien RL, Kellihan HB, Nguyenba TP, Lehmkuhl LB, Lefbom BK, Moise NS, Hogan DF. Utility of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) to distinguish between congestive heart failure and non-cardiac causes of acute dyspnea in cats. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S51-61.

Fu YH, Lin QX, Li XH, Fei HW, Shan ZX, Huang XZ, Liu XY, Yang M, Lin SG,

Zhou SF, Zhang YY, Yu XY. A novel rat model of chronic heart failure following myocardial infarction. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2009; 31: 367-73.

Fuentes VL, Corcoran B, French A, Schober KE, Kleemann R, Justus C. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of pimobendan in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 255-61.

Galante O, Amit G, Zahger D, Wagshal A, Ilia R, Katz A. B-type natriuretic peptide levels stratify the risk for arrhythmia among implantable cardioverter defibrillator patients. *Clin Cardiol* 2008; 31: 586-9.

George I, Xydas S, Klotz S, Hay I, Ng C, Chang J, Xu K, Li Z, Protter AA, Wu EX, Oz MC, Wang J. Long-term effects of B-type natriuretic peptide infusion after acute myocardial infarction in a rat model. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 55: 14-20.

Goetze JP, Jensen G, Moller S, Bendtsen F, Rehfeld JF, Henriksen JH. BNP and N-terminal proBNP are both extracted in the normal kidney. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 8-15.

Günther C, Hildebrandt N, Haßdenteufel E, Henrich E, Schiller S, Schneider M. Influence Of Sample Preparation In Measurement Of N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide In Cats. *Journal Of Veterinary Internal Medicine (Abstract)* 2010; 24: 1559.

Handa T, Nagai S, Ueda S, Chin K, Ito Y, Watanabe K, Tanizawa K, Tamaya M, Mishima M, Izumi T. Significance of plasma NT-proBNP levels as a biomarker in the assessment of cardiac involvement and pulmonary hypertension in patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2010; 27: 27-35.

Hartmann F, Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Anker SD, Amann-Zalan I, Hoersch S, Katus HA. Prognostic impact of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in severe chronic congestive heart failure: a substudy of the Carvedilol Prospective

Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) trial. *Circulation* 2004; 110: 1780-6.

Häussler N. "Brain Natriuretic Peptide" (BNP) bei herzkranken Hunden. (Hochschulschrift, Dissertation). München: Ludwig-Maximilians-Universität 2004;

Hazlett MJ, Maxie MG, Allen DG, Wilcock BP. A Retrospective Study of Heart Disease in Doberman Pinscher Dogs. *Can Vet J* 1983; 24: 205-10.

Heidenreich PA, Gubens MA, Fonarow GC, Konstam MA, Stevenson LW, Shekelle PG. Cost-effectiveness of screening with B-type natriuretic peptide to identify patients with reduced left ventricular ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1019-26.

Hernandez AF, O'Connor CM, Starling RC, Reist CJ, Armstrong PW, Dickstein K, Lorenz TJ, Gibler WB, Hasselblad V, Komajda M, Massie B, McMurray JJ, Nieminen M, Rouleau JL, Swedberg K, Califf RM. Rationale and design of the Acute Study of Clinical Effectiveness of Nesiritide in Decompensated Heart Failure Trial (ASCEND-HF). *Am Heart J* 2009; 157: 271-7.

Hobbs RE, Miller LW, Bott-Silverman C, James KB, Rincon G, Grossbard EB. Hemodynamic effects of a single intravenous injection of synthetic human brain natriuretic peptide in patients with heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996; 78: 896-901.

Hori Y, Tsubaki M, Katou A, Ono Y, Yonezawa T, Li X, Higuchi SI. Evaluation of NT-pro BNP and CT-ANP as markers of concentric hypertrophy in dogs with a model of compensated aortic stenosis. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1118-23.

Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Woo MA, Tillisch JH. The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 789-95.

Hsu A, Kittleson MD, Paling A. Investigation into the use of plasma NT-proBNP concentration to screen for feline hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S63-70.

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.

IDEXX. Cardiopet Interpretive Criteria. IDEXX Homepage 2010a;

IDEXX. Cardiopet Sample tubes. IDEXX Homepage 2010b;

Inoue K, Takei Y. Molecular evolution of the natriuretic peptide system as revealed by comparative genomics. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2006; 1: 69-76.

Itoh H, Pratt RE, Dzau VJ. Interaction of atrial natriuretic polypeptide and angiotensin II on protooncogene expression and vascular cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 1601-9.

Jacobs GJ, Calvert CA. Survival and prognostic factors in Doberman pinschers with congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 1995: 203.

Janda S, Swiston J. Diagnostic accuracy of pleural fluid NT-pro-BNP for pleural effusions of cardiac origin: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med* 2010; 10: 58.

Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, Bayes-Genis A, Ordonez-Llanos J, Santalo-Bel M, Pinto YM, Richards M. NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study. *Eur Heart J* 2006; 27: 330-7.

Januzzi JL, Jr., Camargo CA, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen AA, Krauser DG, Tung R, Cameron R, Nagurney JT, Chae CU, Lloyd-Jones DM, Brown DF, Foran-Melanson S, Sluss PM, Lee-Lewandrowski E, Lewandrowski KB. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. *Am J Cardiol* 2005; 95: 948-54.

Jaubert J, Jaubert F, Martin N, Washburn LL, Lee BK, Eicher EM, Guenet JL. Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (*Npr3*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10278-83.

Jourdain P, Jondeau G, Funck F, Gueffet P, Le Helloco A, Donal E, Aupetit JF, Aumont MC, Galinier M, Eicher JC, Cohen-Solal A, Juilliere Y. Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1733-9.

Jung SW, Kittleson MD. The Effect of Atenolol on NT-proBNP and Troponin in Asymptomatic Cats with Severe Left Ventricular Hypertrophy because of Hypertrophic Cardiomyopathy: A Pilot Study. *J Vet Intern Med* 2011;

Kashiwagi M, Katafuchi T, Kato A, Inuyama H, Ito T, Hagiwara H, Takei Y, Hirose S. Cloning and properties of a novel natriuretic peptide receptor, NPR-D. *Eur J Biochem* 1995; 233: 102-9.

Kellihan HB, Oyama MA, Reynolds CA, Stepien RL. Weekly variability of plasma and serum NT-proBNP measurements in normal dogs. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S93-7.

Kellihan HB, Mackie BA, Stepien RL. NT-proBNP, NT-proANP and cTnI concentrations in dogs with pre-capillary pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol* 2011; 13: 171-82.

Kerr MA, Kenny AJ. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* 1974; 137: 477-88.

Khan AR, Birbach M, Cohen MS, Ittenbach RF, Spray TL, Levy RJ, Gaynor JW. Chronic hypoxemia increases ventricular brain natriuretic peptide precursors in neonatal swine. *Ann Thorac Surg* 2008; 85: 618-23.

Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Garbers DL, Nakao K, Kangawa K. Natriuretic Peptide Signaling via Guanylyl Cyclase (GC)-A: An Endogenous Protective Mechanism of the Heart. *Curr Cardiol Rev* 2009; 5: 45-51.

Kittleson MD, Kienle RD (1998) *Small Animal Cardiovascular Medicine*, 1st edn. Mosby, St. Louis. 1-560

Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 1992; 86: 1081-8.

Kraus MS, Thomason JD, Fallaw TL, Calvert CA. Toxicity in Doberman Pinchers with ventricular arrhythmias treated with amiodarone (1996-2005). *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1-6.

Krishnaswamy P, Lubien E, Clopton P, Koon J, Kazanegra R, Wanner E, Gardetto N, Garcia A, DeMaria A, Maisel AS. Utility of B-natriuretic peptide levels in identifying patients with left ventricular systolic or diastolic dysfunction. *Am J Med* 2001; 111: 274-9.

Lainchbury JG, Troughton RW, Strangman KM, Frampton CM, Pilbrow A, Yandle TG, Hamid AK, Nicholls MG, Richards AM. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide-guided treatment for chronic heart failure: results from the BATTLESCARRED (NT-proBNP-Assisted Treatment To Lessen Serial Cardiac Readmissions and Death) trial. *J Am Coll Cardiol* 2009; 55: 53-60.

Lalor SM, Connolly DJ, Elliott J, Syme HM. Plasma concentrations of natriuretic peptides in normal cats and normotensive and hypertensive cats with chronic kidney disease. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S71-9.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18: 1440-63.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J, Solomon S, Spencer KT, St John Sutton M, Stewart W. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 2006; 7: 79-108.

Latini R, Masson S, Anand I, Judd D, Maggioni AP, Chiang YT, Bevilacqua M, Salio M, Cardano P, Dunselman PH, Holwerda NJ, Tognoni G, Cohn JN. Effects of valsartan on circulating brain natriuretic peptide and norepinephrine in symptomatic chronic heart failure: the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2002; 106: 2454-8.

Latini R, Masson S, Pirelli S, Barlera S, Pulitano G, Carbonieri E, Gulizia M, Vago T, Favero C, Zdunek D, Struck J, Staszewsky L, Maggioni AP, Franzosi MG, Disertori M. Circulating cardiovascular biomarkers in recurrent atrial fibrillation: data from the GISSI-atrial fibrillation trial. *J Intern Med* 2011; 269: 160-71.

Lee CY, Burnett JC, Jr. Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart Fail Rev* 2007; 12: 131-42.

Lee JA, Herndon WE, Rishniw M. The effect of noncardiac disease on plasma brain natriuretic peptide concentration in dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2011; 21: 5-12.

Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; 339: 321-8.

Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, Plebani M. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 358-65.

Lisy O, Lainchbury JG, Leskinen H, Burnett JC, Jr. Therapeutic actions of a new synthetic vasoactive and natriuretic peptide, dendroaspis natriuretic peptide, in experimental severe congestive heart failure. *Hypertension* 2001; 37: 1089-94.

Liu ZL, Wiedmeyer CE, Sisson DD, Solter PF. Cloning and characterization of feline brain natriuretic peptide. *Gene* 2002; 292: 183-90.

Loke I, Squire IB, Davies JE, Ng LL. Reference ranges for natriuretic peptides for diagnostic use are dependent on age, gender and heart rate. *Eur J Heart Fail* 2003; 5: 599-606.

Lopes R, Solter PF, Sisson DD, Oyama MA, Prosek R. Correlation of mitochondrial protein expression in complexes I to V with natural and induced forms of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2006a; 67: 971-7.

Lopes R, Solter PF, Sisson DD, Oyama MA, Prosek R. Characterization of canine mitochondrial protein expression in natural and induced forms of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2006b; 67: 963-70.

Lopez-Alvarez J, Fonfara S, Pedro B, Stephenson H, Cripps PJ, Dukes-McEwan J. Assessment of mechanical ventricular synchrony in Doberman Pinscher with dilated cardiomyopathy. *J Vet Cardiol* 2011;

Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 1995; 378: 65-8.

Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, Clopton P, Koon J, Kazanegra R, Gardetto N, Wanner E, Maisel AS. Utility of B-natriuretic peptide in detecting

diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 2002; 105: 595-601.

Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 1987; 238: 675-8.

Maack T. The broad homeostatic role of natriuretic peptides. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50: 198-207.

MacDonald KA, Kittleson MD, Munro C, Kass P. Brain natriuretic peptide concentration in dogs with heart disease and congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 172-7.

MacLean HN, Abbott JA, Ward DL, Huckle WR, Sisson DD, Pyle RL. N-terminal atrial natriuretic peptide immunoreactivity in plasma of cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 284-9.

Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 161-7.

Maisel AS, McCord J, Nowak RM, Hollander JE, Wu AH, Duc P, Omland T, Storrow AB, Krishnaswamy P, Abraham WT, Clopton P, Steg G, Aumont MC, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kamin R, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA. Bedside B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2010-7.

Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 1986; 324: 473-6.

Martinez-Rumayor A, Richards AM, Burnett JC, Januzzi JL, Jr. Biology of the natriuretic peptides. *Am J Cardiol* 2008; 101: 3-8.

Masson S, Vago T, Baldi G, Salio M, De Angelis N, Nicolis E, Maggioni AP, Latini R, Norbiato G, Bevilacqua M. Comparative measurement of N-terminal pro-brain natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in ambulatory patients with heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 761-3.

Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, Smithies O. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7403-8.

Mäurer J (2009) Diagnostische Parameter für die Dilatative Kardiomyopathie beim Dobermann. In: Tierärztliche Fakultät. LMU, München

Mausberg T-B, Wess G, Simak J, Keller LJ, Drögemüller M. A Locus On Chromosome 5 Is Associated With Dilated Cardiomyopathy In Doberman Pinschers. *PLoS One* 2011; 6

McCullough PA, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Herrmann HC, Steg PG, Duc P, Westheim A, Omland T, Knudsen CW, Storrow AB, Abraham WT, Lamba S, Wu AH, Perez A, Clopton P, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Maisel AS. B-type natriuretic peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of heart failure: analysis from Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study. *Circulation* 2002; 106: 416-22.

McCullough PA, Duc P, Omland T, McCord J, Nowak RM, Hollander JE, Herrmann HC, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Storrow AB, Abraham WT, Lamba S, Wu AH, Perez A, Clopton P, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Maisel AS. B-type natriuretic peptide and renal function in the diagnosis of heart failure: an analysis from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 571-9.

McCullough PA, Sandberg KR. Sorting out the evidence on natriuretic peptides. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4 Suppl 4: S13-9.

McCutcheon LJ, Cory CR, Nowack L, Shen H, Mirsalami M, Lahucky R, Kovac L, O'Grady M, Horne R, O'Brien PJ. Respiratory chain defect of myocardial mitochondria in idiopathic dilated cardiomyopathy of Doberman pinscher dogs. *Can J Physiol Pharmacol* 1992; 70: 1529-33.

McLean AS, Huang SJ, Nalos M, Tang B, Stewart DE. The confounding effects of age, gender, serum creatinine, and electrolyte concentrations on plasma B-type natriuretic peptide concentrations in critically ill patients. *Crit Care Med* 2003; 31: 2611-8.

Melzi d'Eril G, Tagnochetti T, Nauti A, Klersy C, Papalia A, Vadacca G, Moratti R, Merlini G. Biological variation of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in healthy individuals. *Clin Chem* 2003; 49: 1554-5.

Meurs KM, Spier AW, Wright NA, Hamlin RL. Comparison of in-hospital versus 24-hour ambulatory electrocardiography for detection of ventricular premature complexes in mature Boxers. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 222-4.

Meurs KM, Fox PR, Norgard M, Spier AW, Lamb A, Koplitz SL, Baumwart RD. A prospective genetic evaluation of familial dilated cardiomyopathy in the Doberman pinscher. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1016-20.

Meurs KM, Hendrix KP, Norgard MM. Molecular evaluation of five cardiac genes in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2008; 69: 1050-3.

Meurs KM, Lahmers S, Keene BW, Mauceli E, Acland G, Lindblad-Toh K. A Splice Site Mutation In A Gene Encoding For A Mitochondrial Protein Is Associated With The Development Of Dilated Cardiomyopathy In The Doberman Pinscher. *Journal Of Veterinary Internal Medicine (Abstract)* 2010; 24: 660-795.

Mills RM, LeJemtel TH, Horton DP, Liang C, Lang R, Silver MA, Lui C, Chatterjee K. Sustained hemodynamic effects of an infusion of nesiritide (human b-type natriuretic peptide) in heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Natreacor Study Group. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 155-62.

Mills RM, Hobbs RE, Young JB. "BNP" for heart failure: role of nesiritide in cardiovascular therapeutics. *Congest Heart Fail* 2002; 8: 270-3.

Moe GW, Howlett J, Januzzi JL, Zowall H. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide testing improves the management of patients with suspected acute heart failure: primary results of the Canadian prospective randomized multicenter IMPROVE-CHF study. *Circulation* 2007; 115: 3103-10.

Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, Bowles KR, Coveler KJ, Marx JG, Chrisco MA, Murphy RT, Lurie PR, Schwartz RJ, Elliott PM, Vatta M, McKenna W, Towbin JA, Bowles NE. Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 207-15.

Moise NS. Chronic management of tachyarrhythmias in the dog. The 26th annual Waltham/OSU Symposium: Small Animal Cardiology, 2002;

Moonarmart W, Boswood A, Luis Fuentes V, Brodbelt D, Souttar K, Elliott J. N-terminal pro B-type natriuretic peptide and left ventricular diameter independently predict mortality in dogs with mitral valve disease. *J Small Anim Pract* 2010; 51: 84-96.

Morris N, Oyama MA, O'Sullivan ML, Singletary GE. Utility Of NT-ProBNP Assay To Detect Occult Dilated Cardiomyopathy In Doberman Pinschers. *Journal Of Veterinary Internal Medicine (Abstract)* 2009; 23: 686.

Mueller C, Scholer A, Laule-Kilian K, Martina B, Schindler C, Buser P, Pfisterer M, Perruchoud AP. Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and

management of acute dyspnea. *N Engl J Med* 2004; 350: 647-54.

Murdoch DR, McDonagh TA, Byrne J, Blue L, Farmer R, Morton JJ, Dargie HJ. Titration of vasodilator therapy in chronic heart failure according to plasma brain natriuretic peptide concentration: randomized comparison of the hemodynamic and neuroendocrine effects of tailored versus empirical therapy. *Am Heart J* 1999; 138: 1126-32.

Nowatzke WL, Cole TG. Stability of N-terminal pro-brain natriuretic peptide after storage frozen for one year and after multiple freeze-thaw cycles. *Clin Chem* 2003; 49: 1560-2.

O'Grady MR. Outcome of 103 asymptomatic Doberman pinschers: incidence of dilated cardiomyopathy in a longitudinal study. *J Vet Intern Med* 1995a; 9: 199 (Abstract).

O'Grady MR. Echocardiographic findings in 51 normal Doberman pinschers. *J Vet Intern Med* 1995b; 9: 202 (Abstract).

O'Grady MR, Horne R, Gordon SG. Does angiotensin converting enzyme inhibitor therapy delay the onset of congestive heart failure or sudden death in Doberman pinschers with occult dilated cardiomyopathy? *J Vet Intern Med* 1997; 11: 138 (Abstract).

O'Grady MR, Horne R. The prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman pinschers. *Proceedings 16th Annual ACVIM Forum, San Diego, CA, 1998;*

O'Grady MR, O'Sullivan ML. Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 1187-207.

O'Grady MR, Minors SL, O'Sullivan ML, Horne R. Effect of pimobendan on case fatality rate in Doberman Pinschers with congestive heart failure caused by dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 897-904.

O'Grady MR, O'Sullivan ML, Minors SL, Horne R. Efficacy of benazepril hydrochloride to delay the progression of occult dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 977-83.

O'Hanlon R, O'Shea P, Ledwidge M, O'Loughlin C, Lange S, Conlon C, Phelan D, Cunningham S, McDonald K. The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. *J Card Fail* 2007; 13: 50-5.

O'Sullivan ML, O'Grady MR, Minors SL, Kean KMT, Horne R. Occult dilated cardiomyopathy in the Doberman Pinscher, a retrospective study of prognosis in 163 cases. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 406 (Abstract).

O'Sullivan ML, O'Grady MR, Minors SL. Plasma big endothelin-1, atrial natriuretic peptide, aldosterone, and norepinephrine concentrations in normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2007a; 21: 92-9.

O'Sullivan ML, O'Grady MR, Minors SL. Assessment of diastolic function by Doppler echocardiography in normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2007b; 21: 81-91.

O'Sullivan ML, O'Grady MR, Pyle WG, Dawson JF. Evaluation of 10 genes encoding cardiac proteins in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2011; 72: 932-9.

Ogawa A, Seino Y, Yamashita T, Ogata K, Takano T. Difference in elevation of N-terminal pro-BNP and conventional cardiac markers between patients with ST elevation vs non-ST elevation acute coronary syndrome. *Circ J* 2006; 70: 1372-8.

Oikawa S, Imai M, Inuzuka C, Tawaragi Y, Nakazato H, Matsuo H. Structure of dog and rabbit precursors of atrial natriuretic polypeptides deduced from nucleotide sequence of cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 132: 892-9.

Okada Y, Shibasaki K, Kimura K, Matsumoto N, Iguchi Y, Aoki J, Kobayashi K, Sakai K. Brain natriuretic peptide is a marker associated with thrombus in stroke patients with atrial fibrillation. *J Neurol Sci* 2010;

Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998; 280: 750-2.

Omland T, Hagve TA. Natriuretic peptides: physiologic and analytic considerations. *Heart Fail Clin* 2009; 5: 471-87.

Oyama MA, Sisson DD, Solter PF. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. *Am J Vet Res* 2007; 68: 42-7.

Oyama MA, Fox PR, Rush JE, Rozanski EA, Lesser M. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 1496-503.

Oyama MA, Rush JE, Rozanski EA, Fox PR, Reynolds CA, Gordon SG, Bulmer BJ, Lefbom BK, Brown BA, Lehmkuhl LB, Prosek R, Lesser MB, Kraus MS, Bossbaly MJ, Rapoport GS, Boileau JS. Assessment of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for differentiation of congestive heart failure from primary respiratory tract disease as the cause of respiratory signs in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 235: 1319-25.

Oyama MA, Singletary GE. The use of NT-proBNP assay in the management of canine patients with heart disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 545-58.

Pandey KN. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides* 2005; 26: 901-32.

Pemberton CJ, Yandle TG, Rademaker MT, Charles CJ, Aitken GD, Espiner EA. Amino-terminal proBNP in ovine plasma: evidence for enhanced secretion in response to cardiac overload. *Am J Physiol* 1998; 275: H1200-8.

Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA. Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload. *Hypertension* 2000; 36: 355-9.

Pemberton CJ, Yandle TG, Espiner EA. Immunoreactive forms of natriuretic peptides in ovine brain: response to heart failure. *Peptides* 2002; 23: 2235-44.

Petric AD, Stabej P, Zemva A. Dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: Survival, Causes of Death and a Pedigree Review in a Related Line. *J Vet Cardiol* 2002; 4: 17-24.

Pfister R, Hagemester J, Esser S, Hellmich M, Erdmann E, Schneider CA. NT-pro-BNP for diagnostic and prognostic evaluation in patients hospitalized for syncope. *Int J Cardiol* 2010;

Pizarro R, Bazzino OO, Oberti PF, Falconi M, Achilli F, Arias A, Krauss JG, Cagide AM. Prospective validation of the prognostic usefulness of brain natriuretic peptide in asymptomatic patients with chronic severe mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 1099-106.

Porter JG, Arfsten A, Palisi T, Scarborough RM, Lewicki JA, Seilhamer JJ. Cloning of a cDNA encoding porcine brain natriuretic peptide. *J Biol Chem* 1989; 264: 6689-92.

Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 2006; 27: 47-72.

Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Distinguishing cardiac and

noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 238-42.

Rademaker MT, Cameron VA, Charles CJ, Espiner EA, Nicholls MG, Pemberton CJ, Richards AM. Neurohormones in an ovine model of compensated postinfarction left ventricular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H731-40.

Raffan E, Loureiro J, Dukes-McEwan J, Fonfara S, James R, Swift S, Bexfield N, Herrtage ME, Archer J. The cardiac biomarker NT-proBNP is increased in dogs with azotemia. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1184-9.

Ralli S, Horwich TB, Fonarow GC. Relationship between anemia, cardiac troponin I, and B-type natriuretic peptide levels and mortality in patients with advanced heart failure. *Am Heart J* 2005; 150: 1220-7.

Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC, Jr. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 976-82.

Rehman SU, Januzzi JL, Jr. Natriuretic peptide testing in clinical medicine. *Cardiol Rev* 2008; 16: 240-9.

Richards AM, Doughty R, Nicholls MG, Macmahon S, Ikram H, Sharpe N, Espiner EA, Frampton C, Yandle TG. Neurohumoral prediction of benefit from carvedilol in ischemic left ventricular dysfunction. Australia-New Zealand Heart Failure Group. *Circulation* 1999; 99: 786-92.

Richards AM, Doughty R, Nicholls MG, MacMahon S, Sharpe N, Murphy J, Espiner EA, Frampton C, Yandle TG. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: prognostic utility and prediction of benefit from carvedilol in chronic ischemic left ventricular dysfunction. Australia-New Zealand Heart Failure Group. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1781-7.

Romano S, Di Mauro M, Fratini S, Guarracini L, Guarracini F, Poccia G, Penco M. Early diagnosis of left ventricular diastolic dysfunction in diabetic patients: a possible role for natriuretic peptides. *Cardiovasc Diabetol* 2010; 9: 89.

Roques BP, Noble F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 87-146.

Rose RA, Giles WR. Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. *J Physiol* 2008; 586: 353-66.

Rossi A, Enriquez-Sarano M, Burnett JC, Jr., Lerman A, Abel MD, Seward JB. Natriuretic peptide levels in atrial fibrillation: a prospective hormonal and Doppler-echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1256-62.

Rousseau MF, Gurte O, Duprez D, Van Mieghem W, Robert A, Ahn S, Galanti L, Ketelslegers JM. Beneficial neurohormonal profile of spironolactone in severe congestive heart failure: results from the RALES neurohormonal substudy. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1596-601.

Sackner-Bernstein JD, Kowalski M, Fox M, Aaronson K. Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005a; 293: 1900-5.

Sackner-Bernstein JD, Skopicki HA, Aaronson KD. Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. *Circulation* 2005b; 111: 1487-91.

Sarzi Braga S, Vaninetti R, Pedretti RF. Plasma B-type natriuretic peptide predicts atrial fibrillation during rehabilitation after cardiac surgery. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008; 15: 460-6.

Saunders A, Gordon S, Miller M, Achen S, Roland R, Drourr L, Hariu C, Oyama

M. NT-proBNP Concentrations in Canine Congenital Heart Disease. *J Vet Intern Med* [abstract] 2009; 23: 686.

Sawada Y, Suda M, Yokoyama H, Kanda T, Sakamaki T, Tanaka S, Nagai R, Abe S, Takeuchi T. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *J Biol Chem* 1997; 272: 20545-54.

Schirger JA, Heublein DM, Chen HH, Lisy O, Jougasaki M, Wennberg PW, Burnett JC, Jr. Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 126-30.

Schmidt MK, Reynolds CA, Estrada AH, Prosek R, Maisenbacher HW, Sleeper MM, Oyama MA. Effect of azotemia on serum N-terminal proBNP concentration in dogs with normal cardiac function: a pilot study. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S81-6.

Schuller S, Van Israel N, Vanbelle S, Clercx C, McEntee K. Lack of efficacy of low-dose spironolactone as adjunct treatment to conventional congestive heart failure treatment in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2011; 34: 322-31.

Schultz M, Faber J, Kistorp C, Jarlov A, Pedersen F, Wiinberg N, Hildebrandt P. N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) in different thyroid function states. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 54-9.

Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* 1992; 267: 13928-32.

Scott PA, Barry J, Roberts PR, Morgan JM. Brain natriuretic peptide for the prediction of sudden cardiac death and ventricular arrhythmias: a meta-analysis. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 958-66.

Serres F, Pouchelon JL, Poujol L, Lefebvre HP, Trumel C, Daste T, Sampedrano CC, Gouni V, Tissier R, Hawa G, Chetboul V. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *J Vet Cardiol* 2009; 11: 103-21.

Shiple E, Saunders A, Gordon SG, Roland R, Drourr L, Achen S, Miller M. NT-proBNP In Dogs With Atrial Fibrillation. *Journal Of Veterinary Internal Medicine (Abstract)* 2008; 22: 759.

Simak J (2008) Evaluierung echokardiographischer Methoden zur Diagnose der dilatativen Kardiomyopathie beim Dobermann. In: Tierärztliche Fakultät. LMU, München

Simon T, Becker R, Voss F, Bikou O, Hauck M, Licka M, Katus HA, Bauer A. Elevated B-type natriuretic peptide levels in patients with nonischemic cardiomyopathy predict occurrence of arrhythmic events. *Clin Res Cardiol* 2008; 97: 306-9.

Sinclair H, Paterson M, Walker S, Beckett G, Fox KA. Predicting outcome in patients with acute coronary syndrome: evaluation of B-type natriuretic peptide and the global registry of acute coronary events (GRACE) risk score. *Scott Med J* 2007; 52: 8-13.

Singh G, Kuc RE, Maguire JJ, Fidock M, Davenport AP. Novel snake venom ligand dendroaspis natriuretic peptide is selective for natriuretic peptide receptor-A in human heart: downregulation of natriuretic peptide receptor-A in heart failure. *Circ Res* 2006; 99: 183-90.

Singh SN, Fletcher RD, Fisher SG, Singh BN, Lewis HD, Deedwania PC, Massie BM, Colling C, Lazzeri D. Amiodarone in patients with congestive heart failure and asymptomatic ventricular arrhythmia. *Survival Trial of Antiarrhythmic Therapy in Congestive Heart Failure. N Engl J Med* 1995; 333: 77-82.

Sisson D. Plasma levels of ANP, BNP, epinephrine, norepinephrin, serum aldosterone, and plasma renin activity in healthy cats and cats with myocardial disease. *J Vet Intern Med (Abstract)* 2003; 17: 438.

Sisson DD. Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 1105-26.

Steinhart B, Thorpe KE, Bayoumi AM, Moe G, Januzzi JL, Jr., Mazer CD. Improving the diagnosis of acute heart failure using a validated prediction model. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 1515-21.

Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332: 78-81.

Syme HM, Markwell PJ, Pfeiffer D, Elliott J. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 528-35.

Tada H, Ito S, Shinbo G, Tadokoro K, Ito I, Hashimoto T, Miyaji K, Kaseno K, Naito S, Nogami A, Oshima S, Taniguchi K. Significance and utility of plasma brain natriuretic peptide concentrations in patients with idiopathic ventricular arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol* 2006; 29: 1395-403.

Takei Y, Takahashi A, Watanabe TX, Nakajima K, Sakakibara S. A novel natriuretic peptide isolated from eel cardiac ventricles. *FEBS Lett* 1991; 282: 317-20.

Takei Y, Hirose S. The natriuretic peptide system in eels: a key endocrine system for euryhalinity? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282: R940-51.

Takei Y, Ogoshi M, Inoue K. A 'reverse' phylogenetic approach for identification of novel osmoregulatory and cardiovascular hormones in vertebrates. *Front Neuroendocrinol* 2007; 28: 143-60.

Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4239-44.

Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 17300-5.

Tang WH, Francis GS, Morrow DA, Newby LK, Cannon CP, Jesse RL, Storrow AB, Christenson RH, Apple FS, Ravkilde J, Wu AH. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine practice guidelines: Clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Circulation* 2007; 116: e99-109.

Tang WH, Francis GS, Morrow DA, Newby LK, Cannon CP, Jesse RL, Storrow AB, Christenson RH. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Clin Biochem* 2008; 41: 210-21.

Tarnow I, Olsen LH, Kvarn C, Hoglund K, Moesgaard SG, Kamstrup TS, Pedersen HD, Haggstrom J. Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *Vet J* 2009; 180: 195-201.

Taylor JA, Christenson RH, Rao K, Jorge M, Gottlieb SS. B-type natriuretic peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide are depressed in obesity despite higher left ventricular end diastolic pressures. *Am Heart J* 2006; 152: 1071-6.

Thomas CJ, Woods RL. Haemodynamic action of B-type natriuretic peptide substantially outlasts its plasma half-life in conscious dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 369-75.

Tidholm A, Haggstrom J, Hansson K. Effects of dilated cardiomyopathy on the renin-angiotensin-aldosterone system, atrial natriuretic peptide activity, and thyroid hormone concentrations in dogs. *Am J Vet Res* 2001a; 62: 961-7.

Tidholm A, Haggstrom J, Borgarelli M, Tarducci A. Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part I: Aetiology, clinical characteristics, epidemiology and pathology. *Vet J* 2001b; 162: 92-107.

Tidholm A, Jonsson L. Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy. *Vet Pathol* 2005; 42: 1-8.

Tominaga Y, Miyagawa Y, Toda N, Takemura N. The Diagnostic Significance of the Plasma N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Concentration in Asymptomatic Cats with Cardiac Enlargement. *J Vet Med Sci* 2011;

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.

Troughton RW, Prior DL, Pereira JJ, Martin M, Fogarty A, Morehead A, Yandle TG, Richards AM, Starling RC, Young JB, Thomas JD, Klein AL. Plasma B-type natriuretic peptide levels in systolic heart failure: importance of left ventricular diastolic function and right ventricular systolic function. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 416-22.

Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Matsui T, Kinoshita M. Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1228-33.

Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 2001; 23: 261-9.

van Kimmenade R, van Dielen F, Bakker J, Nijhuis J, Crijs H, Buurman W, van Dieijen-Visser M, Greve JW, Pinto Y. Is brain natriuretic peptide production decreased in obese subjects? *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 886-7.

van Kimmenade RR, Januzzi JL, Jr. The evolution of the natriuretic peptides - Current applications in human and animal medicine. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: S9-21.

Vollmar A, Fox PR, Meurs KM, Liu SK. Dilated cardiomyopathy in juvenile doberman pinschers. *J Vet Cardiol* 2003; 5: 23-7.

Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Corey D, Leip EP, Vasani RS. Heritability and genetic linkage of plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 2003; 108: 13-6.

Wei CM, Aarhus LL, Miller VM, Burnett JC, Jr. Action of C-type natriuretic peptide in isolated canine arteries and veins. *Am J Physiol* 1993; 264: H71-3.

Wennberg PW, Miller VM, Rabelink T, Burnett JC, Jr. Further attenuation of endothelium-dependent relaxation imparted by natriuretic peptide receptor antagonism. *Am J Physiol* 1999; 277: H1618-21.

Wess G. The Utility Of NT-proBNP To Differentiate Cardiac And Respiratory Causes Of Dyspnea In Cats. *Journal Of Veterinary Internal Medicine (Abstract)* 2008; 22

Wess G, Simak J, Mahling M, Hartmann K. Cardiac troponin I in Doberman Pinschers with cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2010a; 24: 843-9.

Wess G, Schulze A, Butz V, Simak J, Killich M, Keller LJ, Maeurer J, Hartmann K. Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *J Vet Intern Med* 2010b; 24: 533-8.

Wess G, Maurer J, Simak J, Hartmann K. Use of Simpson's method of disc to detect early echocardiographic changes in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2010c; 24: 1069-76.

Wess G, Schulze A, Geraghty N, Hartmann K. Ability of a 5-minute electrocardiography (ECG) for predicting arrhythmias in Doberman Pinschers with cardiomyopathy in comparison with a 24-hour ambulatory ECG. *J Vet Intern Med* 2010d; 24: 367-71.

Wess G, Butz V, Mahling M, Hartmann K. Evaluation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Am J Vet Res* 2011a; 72: 642-9.

Wess G, Daisenberger P, Mahling M, Hirschberger J, Hartmann K. Utility of measuring plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in detecting hypertrophic cardiomyopathy and differentiating grades of severity in cats. *Vet Clin Pathol* 2011b;

Wong F, Blendis L. Pathophysiology of sodium retention and ascites formation in cirrhosis: role of atrial natriuretic factor. *Semin Liver Dis* 1994; 14: 59-70.

Wu AH, Smith A, Wieczorek S, Mather JF, Duncan B, White CM, McGill C, Katten D, Heller G. Biological variation for N-terminal pro- and B-type natriuretic peptides and implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2003; 92: 628-31.

Wu AH. Serial testing of B-type natriuretic peptide and NTpro-BNP for monitoring therapy of heart failure: the role of biologic variation in the interpretation of results. *Am Heart J* 2006; 152: 828-34.

Yamane T, Takemura N, Inoue H, Soeta S, Oishi M, Amasaki H. Preliminary immunohistochemical study of natriuretic peptide receptor localization in canine and feline heart. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 375-8.

Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8525-9.

Yasuno S, Usami S, Kuwahara K, Nakanishi M, Arai Y, Kinoshita H, Nakagawa Y, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Harada M, Nakao K. Endogenous cardiac natriuretic peptides protect the heart in a mouse model of dilated cardiomyopathy and sudden death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H1804-10.

Yeo KT, Wu AH, Apple FS, Kroll MH, Christenson RH, Lewandrowski KB, Sedor FA, Butch AW. Multicenter evaluation of the Roche NT-proBNP assay and comparison to the Biosite Triage BNP assay. *Clin Chim Acta* 2003; 338: 107-15.

Yukimura T, Ito K, Takenaga T, Yamamoto K, Kangawa K, Matsuo H. Renal effects of a synthetic alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP) in anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol* 1984; 103: 363-6.

Zapata L, Vera P, Roglan A, Gich I, Ordonez-Llanos J, Betbese AJ. B-type natriuretic peptides for prediction and diagnosis of weaning failure from cardiac origin. *Intensive Care Med* 2011; 37: 477-85.

Zieba M, Beardow A, Carpenter C, Farace G, Yeung KK, Ettinger S, Forney S. Analytical Validation of a Commercially Available Canine N-Terminal Prohormone Brain Natriuretic Peptide Elisa. *Journal Of Veterinary Internal Medicine (Abstract)* 2008; 22: 756.

Zimmering TM, Meneses F, Nolte IJ, Simon D. Measurement of N-terminal proatrial natriuretic peptide in plasma of cats with and without cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2009; 70: 216-22.

IX. ANHANG

Tabelle 22: NT-proBNP-Werte in pmol/l der einzelnen Hunde für den jeweiligen Probenotyp (Mean = Mittelwert, EDTA = Ethylendiamintetraacetat).

Hund	Cardiopet	EDTA in Cardiopet	EDTA
1	1699	3030	3030
2	315	501	541
3	2244	3030	3030
4	1002	1640	1725
5	1531	3030	3030
6	152	254	226
7	361	404	533
8	878	1391	1438
9	284	529	541
10	176	302	325
11	1814	3030	3030
12	135	265	256
13	59	77	102
14	2104	3030	3030
15	586	753	802
16	487	628	628
17	305	325	357
Mean	831	1307	1331

Tabelle 23: NT-proBNP-Werte in pmol/l der einzelnen Hunde für den jeweiligen Probenotyp (Mean = Mittelwert, EDTA = Ethylendiamintetraacetat).

Hund	EDTA	Cardiopet
1	1456	1359
2	160	107
3	2914	1675
4	2395	1682
5	853	698
6	39	16
7	44	4
8	199	112
9	1263	821
10	318	227
11	778	549
12	1648	876
13	41	29
14	424	255

Hund	EDTA	Cardiopet
15	634	416
16	2104	1644
17	497	282
18	26	1
19	368	92
20	102	34
21	551	297
22	1362	850
23	212	84
24	521	125
25	1686	923
26	305	97
27	1773	994
28	1336	640
Mean	857	531

Tabelle 24: NT-proBNP-Werte in pmol/l der einzelnen Hunde für den in Abbildung 15 dargestellten Verlauf der NT-proBNP-Werte.

Hund	Untersuchung 1	Untersuchung 2
1	401	163
2	566	99
3	443	144
4	567	488
5	618	318
6	769	56
7	711	552
8	474	485
9	567	1030
10	549	434
11	681	503
12	772	488
13	761	444
14	555	297
15	507	359

Tabelle 25: NT-proBNP-Werte in pmol/l der einzelnen Hunde für den in Abbildung 16 dargestellten Verlauf der NT-proBNP-Werte. Der extreme Wert, der nicht im Diagramm dargestellt worden ist, ist in Klammern angegeben.

Hund	Untersuchung 1	Untersuchung 2
1	413	148
2	501	359
3	496	338
4	592	594
5	501	373
6	642	315
7	594	268
8	479	211
9	435	294
10	486	497
11	466	433
12	452	452
13	544	299
14	444	48
15	431	431
(16)	(1325)	(2596)

Tabelle 26: NT-proBNP-Werte in pmol/l der einzelnen Hunde für den in Abbildung 17 dargestellten Verlauf der NT-proBNP-Werte.

Hund	Untersuchung 1	Untersuchung 2
1	304	745
2	311	491
3	198	284
4	204	515
5	216	321
6	266	233
7	302	457
8	324	413
9	392	752
10	165	284

Tabelle 27: NT-proBNP-Werte in pmol/l der einzelnen Hunde für den in Abbildung 18 dargestellten Verlauf der NT-proBNP-Werte.

Hund	Untersuchung 1	Untersuchung 2
1	261	556
2	365	458
3	179	661
4	339	663
5	354	737
6	280	247
7	234	375
8	367	1196
9	373	696
10	286	418
11	321	833

X. DANKSAGUNG

Mein ganz herzlicher Dank geht an

Herrn PD Dr. Gerhard Wess, meinem Doktorvater, für dieses interessante Thema, seine Unterstützung und die anregenden Diskussionen, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Danke Gerhard für Deine Freundschaft und die tolle Zeit im Kardio Team.

Frau Univ. Prof. Dr. Katrin Hartmann, die, durch die Bereitstellung des notwendigen Arbeitsmaterials, die Erstellung dieser Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht hat und für die Unterstützung während meiner gesamten Zeit als Doktorandin.

Frau Dr. Sibylle Thüre und Herrn Dr. Marco Weiss von der Firma IDEXX für die Durchführung der ganzen Messungen und das geduldige Beantworten vieler Fragen.

Herrn Diplom Statistiker Andre Klima vom Institut für Statistik für seine Beratung und seine unglaubliche Geduld.

Frau Dr. Lisa Keller und Frau Dr. Julia Simak für einen Großteil meiner klinischen Ausbildung und das Ertragen der Worte „ja, aber“. Und nicht zuletzt dafür, dass wir gute Freunde geworden sind.

Elli für unsere unglaublich tolle Freundschaft, ohne die diese Zeit viel schwerer gewesen wäre.

Steffi für das geduldige Zuhören und die Aufheiterungen mit hamburgischem Dialekt.

Dem Kardioteam insbesondere Nina, Anja, Johanna, Nadine, Claudia und Carola für die gemeinsame lustige Zeit.

Meinen Geschwister Hartmut, Julius und Katharina dafür dass es sie gibt und ich immer auf offene Ohren gestoßen bin.

Meiner Mama, ohne deren Unterstützung in jeglicher Art weder das Studium noch die Durchführung dieser Arbeit jemals möglich gewesen wäre. Danke Mama für Deine Unterstützung, für den Rückhalt und Beistand in jeder Situation und dafür,

dass Du immer für mich da bist und mir immer alles ermöglicht hast.

Last but not least Bacci, meinem Hund, die mit ihrer Verrücktheit für Aufheiterung gesorgt und mich damit vom Stress befreit hat.